

日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日            1 9 9 4 年   4 月 2 8 日  
Date of Application:

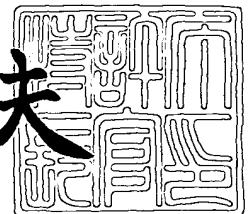
出 願 番 号            平成   6 年特許願第 1 1 4 3 1 6 号  
Application Number:  
[ST. 10/C]:            [ J P 1 9 9 4 - 1 1 4 3 1 6 ]

出   願   人            田 邊   忠  
Applicant(s):

2 0 0 3 年   9 月   9 日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

今 井 康 夫



【書類名】 特許願

【整理番号】 A2386

【提出日】 平成 6年 4月28日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C12N 15/00

【発明の名称】 ヒト由来プロスタサイクリンシンターゼ

【請求項の数】 10

【発明者】

    【住所又は居所】 大阪府豊中市東豊中町 3 丁目 1 8 番 1 3 号

    【氏名】 田邊 忠

【特許出願人】

    【識別番号】 000004569

    【氏名又は名称】 日本たばこ産業株式会社

    【代表者】 水野 繁

【代理人】

    【識別番号】 100080791

    【弁理士】

    【氏名又は名称】 高島 一

    【電話番号】 06-227-1156

【手数料の表示】

    【納付方法】 予納

    【予納台帳番号】 006965

    【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

    【物件名】 明細書 1

    【物件名】 図面 1

    【物件名】 要約書 1

    【物件名】 受託証 2

【書類名】 明細書

【発明の名称】 ヒト由来プロスタサイクリンシンターゼ

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 実質的に配列表の配列番号 12 で示されるヒト由来プロスタサイクリンシンターゼのアミノ酸配列をコードする塩基配列を有する DNA を含む DNA。

【請求項 2】 実質的に配列表の配列番号 11 で示される塩基番号 28 乃至 1527 の塩基配列を有する DNA を含む請求項 1 記載の DNA。

【請求項 3】 配列表の配列番号 11 で示される塩基番号 28 乃至 1527 の塩基配列を有する請求項 2 記載の DNA。

【請求項 4】 実質的に配列表の配列番号 12 で示されるヒト由来プロスタサイクリンシンターゼのアミノ酸配列を有するポリペプチド。

【請求項 5】 配列表の配列番号 12 で示されるヒト由来プロスタサイクリンシンターゼのアミノ酸配列を有する請求項 4 記載のポリペプチド。

【請求項 6】 請求項 1～3 のいずれかに記載の DNA を含有する組換えベクター。

【請求項 7】 請求項 6 記載の組換えベクターにより形質転換された宿主細胞。

【請求項 8】 国際寄託番号 FERM BP-4653 または FERM BP-4654 で識別される形質転換細胞。

【請求項 9】 請求項 7 記載の宿主細胞を培地中で培養して得られる培養物からヒト由来プロスタサイクリンシンターゼを取得することを特徴とするヒト由来プロスタサイクリンシンターゼの製造方法。

【請求項 10】 実質的に配列表の配列番号 12 で示されるアミノ酸配列を有するヒト由来プロスタサイクリンシンターゼに反応性を有する抗体。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】

本発明は、ヒト由来のプロスタサイクリンシンターゼ (Prostacyclin synthase

e、以下、PGISという)のアミノ酸配列を有するポリペプチド、それをコードするDNA、該DNAを含有するベクター、該ベクターで形質転換された宿主細胞および該宿主細胞を培養することによるヒト由来PGISの製造方法に関する。更に、当該PGISまたはその断片に対して反応性を示す抗体に関する。

#### 【0002】

##### 【従来の技術】

PGISは、主として血管内皮細胞のミクロソーム画分に含まれ、プロスタグランジン $I_2$  (以下、PG $I_2$  という)の合成、すなわちプロスタグランジン $H_2$  (以下、PG $H_2$  という)からPG $I_2$  への変換を触媒する酵素である。

#### 【0003】

かかる酵素によって合成されるPG $I_2$  は、強力な血小板凝集抑制作用および血管平滑筋弛緩作用を有する物質である。一方、血小板には当該PG $I_2$  とは相反する作用、すなわち強力な血小板凝集作用および血管平滑筋収縮作用を有するトロンボキサン $A_2$  (以下、TX $A_2$  という)が存在しており、血管系において両物質が拮抗的に作用し生体内の恒常性の維持に参与している〔ブリティッシュジャーナル オブ ファーマコロジー (Br. J. Pharmacol.), 76巻, 3頁, 1982年〕。

#### 【0004】

近年、成人病の一つとして挙げられている心筋梗塞血栓症や動脈硬化症等の循環器系の疾患は、かかるPG $I_2$  とTX $A_2$  の血管内における産生の不均衡、とりわけPG $I_2$  の産生低下に基づく血管系の機能不全によって生じるものと考えられている(同上文献)。

#### 【0005】

このようなPG $I_2$  産生低下が原因と考えられる疾病の治療法として、PG $I_2$  を医薬品として体外から補うことが考えられる。しかし、PG $I_2$  は化学的に極めて不安定な物質であるためPG $I_2$  自体を医薬品として実用化することは困難である。かかる観点から、例えば現在、血液凝固阻止剤、血管拡張剤として安定なPG $I_2$  類縁体の開発が進められている。

#### 【0006】

しかしながら、本来  $PGI_2$  と  $TXA_2$  との均衡のもとに成り立っている生体内の恒常性は、安定な  $PGI_2$  類縁体の投与によって却って崩れる可能性が考えられる。すなわち、安定な  $PGI_2$  類縁体を多量に投与することは、細胞の  $PGI_2$  応答性を低下させ、緊急の場合に  $PGI_2$  に反応できなくなるという危険性を含む〔プロスタグランジンズ、19巻、2頁、1980年〕。

#### 【0007】

従って、血栓症等の治療効果を期待すべく  $PGI_2$  と  $TXA_2$  との不均衡を是正して血管系の正常機能の回復を図るためには、化学的に安定な類縁体を用いる一方で、 $PGIS$ の物理化学的性状及び生物学的性状を解明し、当該  $PGIS$  あるいは  $PGIS$  をコードする DNA を研究試薬として用いて  $PGIS$  と  $PGI_2$  産生の関わりを明らかにすること、および該  $PGIS$  あるいはそれをコードする DNA を医薬品として開発し、 $PGI_2$  の産生を制御することが前述のような  $PGI_2$  と  $TXA_2$  との不均衡に起因する各種疾患の治療に対して重要かつ有意義なことと考えられる。

#### 【0008】

従来、 $PGIS$  に関しては、組織分布、即ち各種組織の血管内皮細胞、非血管平滑筋細胞、及び動脈平滑筋における存在が報告されている〔Advances in Prostaglandin, Thromboxane, and Leukotriene Research, Vol.11, pp.87-92, (1983), 及び J. Biol. Chem., Vol.258, No.9, pp.5922-5926, (1983)〕。また、ブタ及びウシから  $PGIS$  の単離精製が試みられ〔ブタ：Cytochrome P450, Biochemistry, Biophysics and Environmental Implications, pp.103-106 (1982)、ウシ：J. Biol. Chem., Vol.258, No.9, pp.3285-3293 (1983)〕、ウシ  $PGIS$  の N 末端アミノ酸配列および下流の部分アミノ酸配列が報告されている〔Advances in Prostaglandin, Thromboxane, and Leukotriene Research, Vol.17, pp.29-33 (1987)、Biochemical and Biophysical Research Communications, Vol.197, No.3, pp.1041-1048 (1993) 等〕。

#### 【0009】

しかしながら、ヒトの  $PGIS$  については、その単離、精製およびアミノ酸配列について、今だ解明されていない。

**【0010】****【発明が解決しようとする課題】**

本発明の目的は、ヒト由来PGISのアミノ酸配列を明らかにし、当該ヒト由来PGIS及び該PGISをコードするDNAを提供することである。

**【0011】**

該PGIS及びこれをコードするDNAは、①PGISの分子あるいは遺伝子レベルでの物理化学的性状、及び生物学的性状の解析、②PGISの産生調節メカニズム、PGISに係るPGI<sub>2</sub>の産生調節メカニズムの解析、及び③PGI<sub>2</sub>とTXA<sub>2</sub>との産生量不均衡に起因すると考えられる各種循環器系疾患の原因究明および該疾患に対する治療薬の開発のための分子あるいは遺伝子レベルでの解析のための試薬として有用である。また、PGISあるいはそのmRNAに体内組織発現レベルおよび分布を測定するための診断薬として有用である。さらには、それら自身、それらの断片、あるいはそれらの修飾体を疾患部位特異的に生体内に導入することにより、PGI<sub>2</sub>の産生レベルを高めることによる、例えば血栓症、心筋梗塞、動脈硬化、狭心症等の各種循環器系疾患に対する治療薬としての利用が期待される。

**【0012】**

さらに、本発明の目的は、ヒト由来PGISをコードするDNAを含有する組換えベクター、および該ベクターで形質転換された宿主細胞からなるPGISの発現系を提供することであり、さらに該発現系を用いてPGISを遺伝子工学的に製造する方法を提供することである。

**【0013】**

かかる方法により、ヒト由来PGISの簡便かつ効率的な量産が可能となる。

**【0014】**

また、本発明はヒト由来PGISの精製、免疫組織化学的、病因解析に有用なヒト由来PGIS抗体を提供することを目的とする。

**【0015】****【課題を解決するための手段】**

本発明者らは、上述の目的を達成すべく鋭意研究を重ねた結果、ヒト動脈血管

内皮細胞から P G I S をコードする c D N A のクローン化に成功し、その c D N A の塩基配列からヒト由来 P G I S の一次構造を決定して本発明を完成するに至った。

#### 【0016】

すなわち本発明は、実質的に配列番号 12 で示されるヒト由来 P G I S のアミノ酸配列をコードする塩基配列を有する D N A を含む D N A、好ましくは実質的に配列番号 11 に示される塩基番号 28 乃至 1527 の塩基配列を有する D N A を含む D N A、より好ましくは配列番号 11 に示される塩基番号 28 乃至 1527 の塩基配列を有する D N A に関する。

#### 【0017】

また本発明は、上記 D N A を含有する組換えベクター、該ベクターで形質転換された宿主細胞、該宿主細胞を培地中で培養して得られる培養物からヒト由来 P G I S を取得することを特徴とするヒト由来 P G I S の製造方法に関する。

#### 【0018】

さらに本発明は、実質的に配列番号 12 で示されるヒト由来 P G I S のアミノ酸配列を有するポリペプチド、また当該ヒト由来 P G I S に反応性を示す抗体に関する。

#### 【0019】

以下、本発明を詳細に説明する。

本発明のポリペプチドは、P G H<sub>2</sub> を P G I<sub>2</sub> に変換する触媒活性を有し、実質的に後記配列表の配列番号 12 に示されるヒト由来 P G I S のアミノ酸配列を有するポリペプチドである。

#### 【0020】

ここで「実質的に」とは、本発明のポリペプチドは、配列番号 12 に示されるアミノ酸配列を有するポリペプチドに限定されず、当該アミノ酸配列を有するヒト由来 P G I S と同様な免疫学的かつ生物学的活性（ヒト P G I S 活性）を有する限り、配列番号 12 で示されるアミノ酸配列中のアミノ酸の幾つかについて欠失、置換もしくは付加等あってもよいという趣旨である。

#### 【0021】

アミノ酸の欠失、置換もしくは付加部位は特に制限されないが、少なくとも配列番号12に示されるアミノ酸配列中の441位のCys残基周辺領域は保存されている必要がある。というのも、本発明のヒト由来PGISは、そのアミノ酸配列において既知のチトクロームP450とホモロジーを有し、かつC末端側のアミノ酸配列中にチトクロームP450の生物活性発現に重要なヘム結合部位（第5配位子）に相当するCys残基を有することから、チトクロームP450ファミリーに属する新規タンパクであると推定されるからである（生物物理, Vol. 32, No.1, pp.10-15, 1992年参照）。

#### 【0022】

本発明のポリペプチドは、好ましくは配列番号12に示されるヒト由来PGISのアミノ酸配列を有するポリペプチドである。

#### 【0023】

本発明のポリペプチドが有するPGIS活性とは、PGH<sub>2</sub>をPGI<sub>2</sub>に変換する触媒活性をいう。当該PGIS活性は、例えば Salmon, J. A. および Flower, R. J. らの方法 [Methods Enzymol. 86, pp.p91-99 (1982)] に従って、<sup>14</sup>Cラベル化PGH<sub>2</sub>のPGI<sub>2</sub>への変換を、代謝産物である6-ケート-PGF<sub>1α</sub>を薄層クロマトグラフィーにて分離したのち、該6-ケート-PGF<sub>1α</sub>の放射活性を検出することによって測定される。

#### 【0024】

また、本発明は、実質的に配列番号12で示されるヒト由来PGISのアミノ酸配列をコードする塩基配列を有するDNAを含むDNAに関する。

#### 【0025】

当該DNAは、上述のヒト由来PGISのアミノ酸配列をコードする塩基配列を有するDNAを含むものであればいかなるものでもよく、具体的には、配列番号12で示されるアミノ酸配列を有するポリペプチドまたはそれと同等の免疫学的および生物学的活性を有するポリペプチドをコードするDNAが挙げられる。より具体的には、配列番号11で示される塩基配列中、塩基番号28乃至1527で示される塩基配列を含有するDNAを挙げることができる。

#### 【0026】



一般に、遺伝子組換え技術分野では、遺伝暗号の縮重に従い、遺伝子から産生される蛋白質のアミノ酸配列を変えることなくその遺伝子のDNA配列の少なくとも一つの塩基を他の塩基に置換することができる。従って、本発明のDNAは、配列表配列番号 1 1 の塩基番号 2 8 乃至 1 5 2 7 で示される塩基配列を遺伝暗号に基づく置換によって変化された塩基配列を有するDNAをも包含する。

#### 【 0 0 2 7 】

また、本発明のDNAは、いかなる方法で得られるものであってもよい。例えばmRNAから調製される相補DNA（cDNA）、ゲノムDNAから調製されるDNA、化学合成によって得られるDNA、RNAまたはDNAを鋳型としてPCR法で増幅させて得られるDNAおよびこれらの方法を適当に組み合わせて構築されるDNAをも全て包含するものである。

#### 【 0 0 2 8 】

本発明のDNAは、常法に従ってヒト由来PGISのmRNAからcDNAをクローン化する方法、ゲノムDNAを単離してスプライシング処理する方法、化学合成する方法等により取得することができる。

#### 【 0 0 2 9 】

(1) 例えば、ヒト由来PGISのmRNAからcDNAをクローン化する方法としては、以下の方法が例示される。

#### 【 0 0 3 0 】

まず、ヒト動脈血管細胞などヒト由来PGISを産生（分泌）する細胞を培養し、その培養液から該PGISをコードするmRNAを調製する。mRNAの調製は、例えばグアニジンチオシアネート法 [Chirgwin, J. M. et al., Biochem. , 18, 5294 (1979) ]、熱フェノール法もしくはAGPC法等の公知の方法を用いて調製した全RNAをオリゴ（dT）セルロースやポリU-セファロース等によるアフィニティクロマトグラフィーにかけることによって行うことができる。

#### 【 0 0 3 1 】

次いで得られたmRNAを鋳型として、例えば逆転写酵素を用いる等の公知の方法 [例えばOkayama, H. らの方法 {Okayama, H. et al., Mol. Cell. Biol., 2, 161 (1982) 及び同誌 3, 280 (1983)} やGubler, U. とHoffman, B. J. の方法 {

Gubler, H. and Hoffman, B. J., Gene, 25, 263 (1983) } が例示される。] で c DNA 鎖を合成し、c DNA の二本鎖 c DNA への変換を行う。この c DNA をプラスミドベクターもしくはファージベクターに組み込み、大腸菌を形質転換して、あるいはインビトロパッケージング後大腸菌に形質移入 (トランスフェクト) することにより c DNA ライブラリーを作製する。

#### 【0 0 3 2】

ここで用いられるプラスミドベクターとしては、宿主内で複製保持されるものであれば特に制限されず、また用いられるファージベクターとしても宿主内で増殖できるものであれば良い。常法的に用いられるクローニング用ベクターとして pUC119, λgt10, λgt11 等が例示される。ただし、後述の免疫学的スクリーニングに供する場合は、宿主内で PGIS 遺伝子を発現させうるプロモーターを有したベクターであることが好ましい。

#### 【0 0 3 3】

プラスミドに c DNA を組み込む方法としては、例えば Maniatis, T. ら、モレキュラークローニング, ア・ラボラトリー・マニュアル (Molecular Cloning, A Laboratory Manual), Cold Spring Harbor Laboratory, p.239 (1982) に記載の方法などが挙げられる。また、ファージベクターに c DNA を組み込む方法としては、Hyunh, T. V. らの方法 [Hyunh, T. V., DNA Cloning, a practical approach, 1, 49 (1985) } などが挙げられる。簡便には、市販のライゲーションキット (例えば、宝酒造製等) を用いることもできる。このようにして得られる組換えプラスミドやファージベクターは、原核細胞 (例えば、E. coli HB101, DH5 または MC1061/P3 等) 等の適当な宿主に導入する。

#### 【0 0 3 4】

プラスミドを宿主に導入する方法としては、Maniatis, T. らのモレキュラークローニング, ア・ラボラトリー・マニュアル (Molecular Cloning, A Laboratory Manual), Cold Spring Harbor Laboratory, p.239 (1982) に記載の塩化カルシウム法または塩化カルシウム/塩化ルビジウム法、エレクトロポレーション法等が挙げられる。また、ファージベクターを宿主に導入する方法としてはファージ DNA をインビトロパッケージングした後、増殖させた宿主に導入する方法等が

例示される。インビトロパッケージングは、市販のインビトロパッケージングキット（例えば、ストラタジーン社製、アマシャム社製等）を用いることによって簡便に行うことができる。

#### 【 0 0 3 5 】

上記の方法によって作製された c D N A ライブラリーから、本発明の P G I S をコードする c D N A を単離する方法は、一般的な c D N A スクリーニング法を組み合わせることによって行うことができる。

#### 【 0 0 3 6 】

例えば、別個にヒト P G I S のアミノ酸配列に対応すると考えられるオリゴヌクレオチドを化学合成したのち、これを  $^{32}\text{P}$  でラベルしてプローブとなし、公知のコロニーハイブリダイゼーション法 [Crunstein, M. and Hogness, D.S.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72, 3961 (1975)] またはプラークハイブリダイゼーション法 [Molecular Cloning, A Laboratory Manual), Cold Spring Harbor Laboratory, p.239 (1982)] により、目的の c D N A を含有するクローンをスクリーニングする方法、P C R プライマーを作製し P G I S の特定領域を P C R 法により増幅し、該領域をコードする D N A 断片を有するクローンを選択する方法等が挙げられる。また、c D N A を発現しうるベクター（例えば、 $\lambda$  g t 1 1 ファージベクター）を用いて作製した c D N A ライブラリーを用いる場合には、後述の本発明 P G I S 抗体を用いる抗原抗体反応を利用して、目的のクローンを選択することができる。大量にクローンを処理する場合には、P C R 法を利用したスクリーニング法を用いることが好ましい。

#### 【 0 0 3 7 】

この様にして得られた D N A の塩基配列はマキサム・ギルバート法 [Maxam, A .M. and Gilbert, W., Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 74, 560 (1977)] あるいはファージ M 1 3 を用いたジデオキシヌクレオチド合成鎖停止の方法 [Sanger, F.ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 5463-5467 (1977)] によって決定することができる。P G I S 遺伝子は、その全部または一部を上記のようにして得られるクローンから制限酵素等により切り出すことにより取得できる。

#### 【 0 0 3 8 】

(2) また、ヒト動脈血管細胞のゲノム DNA から P G I S をコードする DNA を単離することによる調製方法としては、例えば以下の方法が例示される。

【 0 0 3 9 】

ヒト動脈血管細胞を好ましくは S D S またはプロテナーゼ K 等を用いて溶解し、フェノールによる抽出を反復して DNA の脱蛋白質を行う。RNA を好ましくはリボヌクレアーゼにより消化する。得られる DNA を適当な制限酵素により部分消化し、得られる DNA 断片を適当なファージまたはコスミドで増幅しライブラリーを作成する。そして目的の配列を有するクローンを、例えば放射性標識された DNA プローブを用いる方法等により検出し、該クローンから P G I S の遺伝子の全部または一部を制限酵素等により切り出し取得する。

【 0 0 4 0 】

(3) また、化学的合成による本発明の DNA の製造は、配列表配列番号 1 1 に示される塩基配列をもとにして、常法に従って行うことができる。

【 0 0 4 1 】

さらに本発明は、上述の P G I S をコードする DNA を含有する組換えベクターに関する。本発明の組換えベクターとしては、原核細胞及び／または真核細胞の各種の宿主内で複製保持または自己増殖できるものであれば特に制限されず、プラスミドベクターおよびファージベクターが包含される。

【 0 0 4 2 】

当該組換えベクターは、簡便には当業界において入手可能な組換え用ベクター（プラスミド DNA およびバクテリアファージ DNA）に本発明のヒト由来 P G I S をコードする DNA を常法により連結することによって調製することができる。用いられる組換え用ベクターとして具体的には、大腸菌由来のプラスミドとして例えば pBR322, pBR325, pUC12, pUC13 など、酵母由来プラスミドとして例えば pSH19, pSH15 など、枯草菌由来プラスミドとして例えば pUB110, pTP5, pC194 などが例示される。また、ファージとしては、λファージなどのバクテリオファージが、さらにレトロウイルス、ワクシニヤウイルス、核多角体ウイルスなどの動物や昆虫のウイルス [pVL1392, pBK283, Autographa californica 多核体ウイルス (AcNPV), Bombyx mori 多核体ウイルス (BmNPV)] が例示される。

## 【0043】

P G I S 遺伝子を発現させP G I Sを生産させる目的においては、発現ベクターが有用である。発現ベクターとしては、原核細胞および／または真核細胞の各種の宿主細胞中でP G I S 遺伝子を発現し、これら蛋白質を生産する機能を有するものであれば特に制限されない。好ましくは、昆虫細胞に感染し、該細胞中でP G I S を産生する昆虫ウイルス由来の発現ベクターである。

## 【0044】

宿主細胞として細菌、特に大腸菌を用いる場合、一般に発現ベクターは少なくともプロモーター・オペレーター領域、開始コドン、本発明P G I S をコードするDNA、終止コドン、ターミネーター領域および複製可能単位から構成される。

## 【0045】

宿主として酵母、動物細胞または昆虫細胞を用いる場合、発現ベクターは少なくともプロモーター、開始コドン、本発明ポリペプチドをコードするDNA、終止コドンを含んでいることが好ましい。またシグナルペプチドをコードするDNA、エンハンサー配列、本発明ポリペプチドの5'側および3'側の非翻訳領域、スプライシング接合部、ポリアデニレーション部位、選択マーカー領域または複製可能単位などを含んでもよい。

## 【0046】

細菌中で本発明のポリペプチドを発現させるためのプロモーター・オペレーター領域は、プロモーター、オペレーターおよび Shine-Dalgarno(SD) 配列（例えば、AAGGなど）を含むものである。例えば宿主が大腸菌の場合、好適にはT r p プロモーター、l a c プロモーター、r e c A プロモーター、λ P L プロモーター、l p p プロモーターなどを含むものが例示される。酵母中で本発明のP G I S を発現させるためのプロモーターとしては、P H 0 5 プロモーター、P G K プロモーター、G A P プロモーター、A D H プロモーターが挙げられ、宿主がバチルス属菌の場合は、S L 0 1 プロモーター、S P 0 2 プロモーター、p e n P プロモーターなどが挙げられる。また、宿主が動物細胞等の真核細胞である場合、S V 4 0 由来のプロモーター、レトロウイルスのプロモーター、ヒートショ

ックプロモーター、核多角体ウイルスの有するポリヘドリンプロモーターなどが挙げられる。しかし、特にこれらに限定されるものではない。また、発現にはエンハンサーの利用も効果的な方法である。

#### 【0047】

好適な開始コドンとしては、メチオニンコドン（ATG）が例示される。

#### 【0048】

終止コドンとしては、常用の終止コドン（例えば、TAG, TGAなど）が例示される。

#### 【0049】

ターミネーター領域としては、通常用いられる天然または合成のターミネーターを用いることができる。

#### 【0050】

複製可能単位とは、宿主細胞中でその全DNA配列を複製することができる能力をもつDNAをいい、天然のプラスミド、人工的に修飾されたプラスミド（天然のプラスミドから調製されたDNAフラグメント）および合成プラスミド等が含まれる。好適なプラスミドとしては、E. coli ではプラスミドpBR322、もしくはその人工的修飾物（pBR322を適当な制限酵素で処理して得られるDNAフラグメント）が、酵母では酵母2 $\mu$ プラスミド、もしくは酵母染色体DNAが、また哺乳動物細胞ではプラスミドpRSVneo ATCC 37198, プラスミドpSV2dhfr ATCC 37145, プラスミドpdBPV-MMTneo ATCC 37224, プラスミドpSV2neo ATCC 37149等があげられる。

#### 【0051】

エンハンサー配列、ポリアデニレーション部位およびスプライシング接合部位については、例えばそれぞれSV40に由来するもの等、当業者において通常使用されるものを用いることができる。

#### 【0052】

選択マーカーとしては、通常使用されるものを常法により用いることができる。例えばテトラサイクリン、アンピシリン、またはカナマイシン等の抗生物質耐性遺伝子等が例示される。

**【0053】**

本発明の発現ベクターは、少なくとも、上述のプロモーター、開始コドン、本発明のPGISをコードするDNA、終止コドンおよびターミネーター領域を連続的かつ環状に適当な複製可能単位に連結することによって調製することができる。またこの際、所望により制限酵素での消化やT4DNAリガーゼを用いるライゲーション等の常法により適当なDNAフラグメント（例えば、リンカー、他のレストリクションサイトなど）を用いることができる。

**【0054】**

本発明の形質転換体は、上述の発現ベクターを宿主細胞に導入することにより調製することができる。

**【0055】**

宿主細胞としては、例えば微生物〔細菌（例えば、エシェリキア属菌、バチルス属菌）、酵母（例えば、サッカロマイセス属など）、動物細胞および昆虫細胞など〕が挙げられる。具体的には、エシェリキア属菌ではエシェリキア・コリ（*Escherichia coli*）K12DH1, M103, JA221, HB101, C600, XL-1 Blue, JM109などが例示される。バチルス属菌ではバチルス・サチリス（*Bacillus subtilis*）207-21などが挙げられる。酵母としてはサッカロマイセス・セレビシエ（*Saccharomyces cerevisiae*）AH22, AH22R<sup>-</sup>, NA87-11A, DKD-5Dなどが挙げられる。動物細胞としてはサル細胞COS-7, Vero, チャイニーズハムスター細胞CHO, マウスL細胞, ヒトFL細胞などが挙げられる。昆虫細胞としてはBmN4, Sf9などが挙げられる。好ましくは、昆虫細胞である。

**【0056】**

一般にDNA配列のクローニングおよびベクターの組立てのための宿主細胞としては原核細胞が好ましい。組立てられた発現ベクターは次に適当な宿主細胞に形質転換されるが、この際の宿主細胞としては原核細胞のみならず真核細胞をも使用することができる。好ましくは、昆虫細胞（BmN4, Sfなど）である。

**【0057】**

発現ベクターの宿主細胞への導入〔形質転換（本発明では、形質移入を含む概念で用いる。）〕は従来公知の方法を用いて行うことができる。

例えば、細菌（大腸菌, *Bacillus subtilis* 等）の場合は、例えばCohen らの方法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 69, 2110 (1972)]、プロトプラスト法 [Mol. Gen. Genet., 168, 111 (1979)] やコンピテント法 [J. Mol. Biol., 56, 209 (1971)] によって、*Saccharomyces cerevisiae*の場合は、例えばHinnenらの方法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 75, 1927 (1978)] やリチウム法 [J. Bacteriol., 153, 163 (1983)] によって、動物細胞の場合は、例えばGrahamの方法 [Virology, 52, 456 (1973)]、昆虫細胞の場合は、例えばSummers らの方法 [Mol. Cell. Biol. 3, 2156-2165 (1983)] によってそれぞれ形質転換することができる。

#### 【 0 0 5 8 】

本発明のヒト由来 P G I S は、上記の如く調製される発現ベクターを含む形質転換体（本発明では形質移入体を包含する意味で使用する。）を栄養培地で培養することによって製造することができる。

#### 【 0 0 5 9 】

栄養培地は、宿主細胞（形質転換体）の生育に必要な炭素源、無機窒素源もしくは有機窒素源を含んでいることが好ましい。炭素源としては、例えばグルコース、デキストラン、可溶性デンプン、ショ糖などが、無機窒素源もしくは有機窒素源としては、例えばアンモニウム塩類、硝酸塩類、アミノ酸、コーンスチープ・リカー、ペプトン、カゼイン、肉エキス、大豆粕、バレイショ抽出液などが例示される。また所望により他の栄養素 [例えば、無機塩（例えば塩化カルシウム、リン酸二水素ナトリウム、塩化マグネシウム）、ビタミン類、抗生物質（例えばアンピシリン、カナマイシン等）など] を含んでいてもよい。

#### 【 0 0 6 0 】

培養は当業界において知られている方法により行われる。培養条件、例えば温度、培地の pH および培養時間は、P G I S の最高力価が得られるように適宜選択される。

#### 【 0 0 6 1 】

なお、下記に宿主細胞に応じて用いられる具体的な培地および培養条件を例示するが、何らこれらに限定されるものではない。



## 【 0 0 6 2 】

宿主が細菌，放線菌，酵母，糸状菌である場合、例えば上記栄養源を含有する液体培地が適当である。好ましくは、pHが5～8である培地である。

## 【 0 0 6 3 】

宿主が大腸菌の場合、好ましい培地としてM9培地 [Miller. J., Exp. Mol. Genet, p.431, Cold Spring Harbor Laboratory, New York (1972)] が例示される。かかる場合、培養は、必要により通気，攪拌をしながら、通常14～43℃、約3～24時間行うことができる。

## 【 0 0 6 4 】

宿主がBacillus属菌の場合、必要により通気，攪拌をしながら、通常30～40℃、約16～96時間行うことができる。

## 【 0 0 6 5 】

宿主が酵母である場合、培地として、例えばBurkholder最小培地 [Bostian. K. L. et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, 4505 (1980)] が挙げられ、pHは5～8であることが望ましい。培養は通常約20～35℃で約14～144時間行なわれ、必要により通気や攪拌を行うこともできる。

## 【 0 0 6 6 】

宿主が動物細胞の場合、培地として例えば約5～20%の胎児牛血清を含むMEM培地 [Science, 122, 501 (1952)]，DMEM培地 [Virology, 8, 396 (1959)]，RPMI 1640培地 [J. Am. Med. Assoc., 199, 519 (1967)]，199培地 [proc. Soc. Exp. Biol. Med., 73, 1 (1950)] 等を用いることができる。培地のpHは約6～8であるのが好ましく、培養は通常約30～40℃で約15～60時間行なわれ、必要により通気や攪拌を行うこともできる。

## 【 0 0 6 7 】

宿主が昆虫細胞の場合、例えば胎児牛血清を含むGrace's 培地 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 8404 (1985)] 等が挙げられ、そのpHは約5～8であるのが好ましい。培養は通常約20～40℃で15～100時間行なわれ、必要により通気や攪拌を行うこともできる。

## 【 0 0 6 8 】

本発明のヒト由来 P G I S は、上記培養により得られる培養物より以下のようにして取得できる。

**【 0 0 6 9 】**

すなわち、本発明のヒト由来 P G I S が、培養物のうち培養液中に存在する場合は、得られた培養物を濾過または遠心分離等の方法で培養濾液（上清）を得、該培養濾液から天然または合成蛋白質を精製並びに単離するために一般に用いられる常法に従って該 P G I S を精製、単離する。

**【 0 0 7 0 】**

単離、精製方法としては、例えば塩析、溶媒沈澱法等の溶解度を利用する方法、透析、限外濾過、ゲル濾過、ドデシル硫酸ナトリウムーポリアクリルアミドゲル電気泳動など分子量の差を利用する方法、イオン交換クロマトグラフィーやヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィーなどの荷電を利用する方法、アフィニティークロマトグラフィーなどの特異的親和性を利用する方法、逆相高速液体クロマトグラフィーなどの疎水性の差を利用する方法、等電点電気泳動などの等電点の差を利用する方法などが挙げられる。

**【 0 0 7 1 】**

一方、本発明ヒト由来 P G I S が培養された形質転換体のペリプラズムまたは細胞質内に存在する場合は、培養物を濾過または遠心分離などの常法に付して菌体あるいは細胞を集め、適当な緩衝液に懸濁し、例えば超音波やリゾチーム及び凍結融解などの方法で細胞等の細胞壁および／または細胞膜を破壊した後、遠心分離やろ過などの方法で P G I S を含有する膜画分を得る。該膜画分をトリトン等の界面活性剤を用いて可溶化して粗溶液を得る。そして、当該粗溶液を先に例示したような常法を用いて処理することにより、本発明 P G I S を単離、精製することができる。

**【 0 0 7 2 】**

また、本発明は、上述のヒト由来 P G I S に反応性を有する抗体に関する。本発明の抗体は、上記性質を有するポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体を共に包含する。本発明の抗体は、常法に従って取得することができる。

**【 0 0 7 3 】**

例えば、本発明のモノクローナル抗体は、いわゆる細胞融合によって製造されたハイブリドーマから製造することができる。即ち、抗体産生細胞と骨髄細胞との間に、融合ハイブリドーマを形成させ、当該ハイブリドーマをクローン化し、ヒト由来 P G I S のアミノ酸配列の一部または全部を有するポリペプチドを抗原としてそれに対して特異的親和性を示す抗体を生産するクローンを選択することによって製造される。その操作は、免疫抗原として本発明のヒト由来 P G I S を使用する以外は、従来既知の手段を用いることができる。

#### 【0074】

免疫原は、例えば完全フロインドアジュバンドと混和後、動物の免疫用として使用される。動物としては、例えばマウス、ラット、ウサギ等が例示される。免疫は動物の皮下、筋肉内、腹腔内に約 5 ～ 200  $\mu$ g / 回を注射することにより行われる。初回免疫から約 1 ～ 2 週間毎に 1 ～ 4 度免疫を行い、さらに約 1 ～ 4 週間後に最終免疫を行う。最終免疫より約 3 ～ 5 日後、免疫動物から抗体産生細胞を分取する。抗体産生細胞としては、脾細胞、リンパ節細胞等が挙げられる。

#### 【0075】

骨髄細胞としては、例えばマウス、ラット、ヒト由来のものが使用される。例えばマウスミエローマ P 3 · X 6 3 · A g 8, P 3 · X 6 3 · A g 8 - U 1, P 3 · N S 1 - A g 4, S P 2 / 0 - A g 1 4, X 6 3 - A g 8 · 6 5 3 等が例示される。抗体産生細胞と骨髄細胞とは同種動物由来であることが好ましい。

#### 【0076】

細胞融合は、例えばネイチャー、第 266 巻、550 頁 (1977) に記載の方法またはこれに準じる方法によって行われる。この際、30 ～ 50 % ポリエチレングリコール (平均分子量 1,000 ～ 4,000) を用いて 30 ～ 40 °C の温度下、約 1 ～ 3 分間程度反応させることによって行われる。

#### 【0077】

細胞融合によって得られた細胞は目的とするモノクローナル抗体を生産するクローンのスクリーニングに付される。すなわち、当該細胞を例えばマイクロプレート中で培養し、増殖の見られたウェルの培養上清中の抗体価を、例えば酵素抗体法等によって測定し、適切な抗体を生産しているウェルを得る。このようなウ

エルから更に例えば限界希釈法によってクローニングを行ってクローンを得る。  
本発明のモノクローナル抗体は、当該ハイブリドーマ細胞クローンを通常の培養方法、高密度培養方法あるいはスピナーフラスコ培養方法等の培養上清よりプロテインA結合担体あるいは抗マウスイムノグロブリン結合担体を用いたアフィニティクロマトグラフィーにより精製することにより得られる。

#### 【0078】

また培養したハイブリドーマ細胞を、予めプレステン処理した同系マウス腹腔に注射することにより腹水として得られ、これを硫酸塩析した後DEAEイオン交換クロマトグラフィーによりIgG画分として精製し調製することができる。

#### 【0079】

##### 【発明の効果】

本発明は、ヒト由来のPGISのアミノ酸配列、該配列を有する酵素をコードするDNAの塩基配列を初めて明らかにするものである。かかるアミノ酸配列および塩基配列の解明に基づいて、本発明は遺伝子工学的手法によるPGISの製造およびこれに関連する発現系を提供する。

#### 【0080】

本発明のPGIS及びこれをコードするDNAは、

- ①PGISの分子あるいは遺伝子レベルでの物理化学的性状、及び生物学的性状の解析、

#### 【0081】

- ②PGISの産生調節メカニズム、PGISに係るPGI<sub>2</sub>の産生調節メカニズムの解析、及び

#### 【0082】

- ③PGI<sub>2</sub>とTXA<sub>2</sub>との産生量不均衡に起因すると考えられる各種循環器系疾患の原因究明および該疾患に対する治療薬の開発のための分子あるいは遺伝子レベルでの解析、

のための試薬として有用である。

#### 【0083】

また、PGISあるいはそのmRNAに体内組織発現レベルおよび分布を測定

するための診断薬として有用である。

【0084】

さらには、それら自身、それらの断片、あるいはそれらの修飾体を疾患部位特異的に生体内に導入することにより、PGI<sub>2</sub>の産生レベルを高めることによる、例えば血栓症、心筋梗塞、動脈硬化、狭心症等の各種循環器系疾患に対する治療薬としての利用が期待される。

【0085】

さらに、本発明のヒト由来PGISをコードするDNAを含有する組換えベクター、および該ベクターで形質転換された宿主細胞からなるPGISの発現系は、ヒト由来PGISの簡便かつ効率的な量産を可能とする遺伝子工学的製造に有用である。

【0086】

また、本発明のヒト由来PGIS抗体は、ヒト由来PGISの精製、免疫組織化学的、病因解析〔各種組織（子宮、心臓、骨格筋、肺、前立腺等）の特異染色〕に有用である。

【0087】

本発明の実施例において用いるプラスミド、制限酵素等の酵素、T4DNAリガーゼ及び他の物質は市販のものであり、常法に従って使用することができる。cDNAのクローニング、塩基配列の決定、宿主細胞のトランスフェクション、形質移入体の培養、得られる培養物からのPGISの採取、精製等および抗体の取得に用いられた操作についても当業者によく知られているものであるか、文献により知ることのできるものである。

【0088】

また、本発明で用いるpHPGIS36（PBJT-BA-4、受託番号FERM BP-4653）およびpHPGIS135（PBJT-BA 5、受託番号FERM BP-4654）は、通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所に国際寄託されている。

【0089】

【実施例・参考例】

以下、本発明を具体的に説明するため実施例および参考例を示すが、本発明はこれら実施例等によって何ら制限されるものではない。

#### 【0090】

##### 実施例1 cDNA塩基配列の決定

###### (1) $\lambda$ h P G I S 1 4 1 の作製

ヒトゲノムライブラリー (Genomic Lung fibroblast cell line, W I 38、クローンテック社製) を  $2 \times 10^5$  PFU 程まき、本発明者が先に作製したウシ c D N A (Tanabe, T., Hara, S., Miyata, A., Brugger, R., and Ullrich, V. (1993) in Abstract book of 3rd international conference on eicosanoid and other bioactive lipids in cancer, inflammation and radiation Injury, pp. 137 参照) をプローブとして、ブランクハイブリダイゼーションによるスクリーニングを行った。

#### 【0091】

その結果、4つのポジティブシグナルを得て、そのうちの1つを単一ブランクにまで単離した。これを液体培養することにより大量のファージDNAを調製して、精製後種々の制限酵素消化によるマッピングを行った。サザンハイブリダイゼーションにより、エクソンを含むフラグメントを同定して、DNAシーケンスによる構造解析を行い、最終的に単離されたクローン ( $\lambda$  h P G I S 1 4 1) がヒト P G I S をコードするものであることを確認した。

#### 【0092】

このようにして得られた  $\lambda$  h P G I S 1 4 1 について、制限酵素サイトマッピングや塩基配列決定など構造解析した結果、 $\lambda$  h P G I S 1 4 1 はウシ P G I S の c D N A の塩基配列の 673 ~ 855 に相当する領域を含んでいることが確認された (配列番号8)。

#### 【0093】

この得られた  $\lambda$  h P G I S 1 4 1 の c D N A フラグメントの塩基配列をもとに、配列表配列番号1~4に示す配列を有するプライマー [配列番号1: P1プライマー (674-689)、配列番号2: P2プライマー (699-718)、配列番号3: P3プライマー (696-713)、配列番号4: P4プライマー (805-822)] を合成した。

## 【0094】

## (2) PCR法によるcDNAの増幅

該プライマーを用いて、ヒト動脈血管内皮細胞(以下、HAECという。クラボー社製) 1  $\mu$ gの poly(A)<sup>+</sup> RNA (mRNA) を鋳型として、3' 下流領域および5' 上流領域のcDNAをそれぞれPCR法により増幅した (Biochem. Biophys. Res. Commun. 178, 1479-1484)。

## 【0095】

3' 下流領域に相当するcDNAを増幅するために、まずdT<sub>17</sub>アダプター (5'-GACTCGAGTCGACATCGA(T)<sub>17</sub>-3'、配列番号5) でプライムし、伸長作成したファーストcDNA鎖をP1プライマー(674-689) およびアダプタープライマー (配列番号6) で、ついでP2プライマー(699-718) 及びアダプタープライマー (配列番号6) を用いて増幅した。一方、5' 上流領域のcDNAは5' RACEシステム (GIBCO BRL) を用いて増幅した。プロトコールに従って、ホモメリックdCテイルをファーストcDNA鎖につけて、更にセカンドcDNA鎖をアダプタープライマー (5'-(CUA)<sub>4</sub> GGCCACGCGTCGACTAGTACGGGIIGGGIIGGGIIG-3') (配列番号7) を用いて作成した。第1段階の増幅はP4プライマーとアダプタープライマー (配列番号7) とを用いて行った。次いで第2段階の増幅をP3プライマーとアダプタープライマー (配列番号7) とを用いて行った。なお、PCR法は下記のサイクロプロファイルに従って35サイクル行った。

## 【0096】

変性	94℃, 1分
アニーリング	54℃, 1分
伸長	72℃, 3分

## 【0097】

各PCR生成物 (3' 下流領域増幅産物、5' 下流領域増幅産物) から一部を取り出して、それぞれを1%アガロースゲルを用いた電気泳動で精製を行った。ウシPGISのcDNA (pBPGISI) をプローブとしたサザンハイブリダイゼーションにより、該プローブにクロスハイブリダイズしたバンドからDNAを抽出して、得られたDNAをpBluescriptII SK(-) にクローン化した。

## 【0098】

すなわち、以下の手順に従ってクローン化、スクリーニングを行った。

- (1)電気泳動後、ゲルからシグナルの見られたバンドを切り出す。
- (2)アガラーゼ消化を40℃で1時間行う（アガラーゼ1unit/100 $\mu$ lゲル）。
- (3)DNAをフェノールで抽出した後、エタノール沈澱する。
- (4)該DNAエタノール沈澱を滅菌水に溶解後、37℃で1時間のポリヌクレオチドカイネース処理する。
- (5)クレノウフラグメントにより、末端の修復を行う（16℃、1時間）。
- (6)Takara ligation kit によるライゲーションを行う。
- (7)常法に従い、トランスフォーメーションを行う。
- (8)プレートにまく。
- (9)常法に従ってレプリカを作成する。
- (10)レプリカのニトロセルロースフィルターをウシPGISのcDNAをプローブとして用いて、常法に従ってコロニーハイブリダイゼーションを行う。

## 【0099】

尚、ハイブリダイゼーションは、6 $\times$ SSC〔1 $\times$ SSCは、0.15M NaCl、15mM クエン酸ナトリウム（pH7.0）を含有する〕、5 $\times$ Denhardt's 溶液、250 $\mu$ g/ml サケ精子DNA、0.1% SDSおよびランダムプライミング法によりラベル化したcDNAのフラグメント（10<sup>6</sup> cpm/ml）の中で60℃で行った。得られたフィルターに対して3 $\times$ SSC、0.1% SDS中で室温下、5分間の洗浄を2回、それから0.1 $\times$ SSC、0.1% SDS中で50℃、15分間の洗浄を2回行った。該フィルターを風乾し、-80℃で12～16時間、増感スクリーンを用いてフジX線フィルムを当てた。

## 【0100】

得られたインサートDNAをpBluescriptII SK(-) にサブクローニングした。

## 【0101】

これにより、ヒト由来PGISの3' 下流領域のDNAを含有するクローンpHPGIS135および5' 上流領域のDNAを含有するクローンpHPGIS36を取得した。次に、サンガー法〔Sanger, F., Nickle, S., and Coulson,



A.R. (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 5463-5467] に従って、Taq dye プライマーサイクル配列キット（アプライドバイオシステムズ社製）を用いてモデル 3 7 3 A DNAシーケンサー（アプライドバイオシステムズ社製）によって、各クローンの挿入DNAの塩基配列を決定した。これにより、p H P G I S 3 6 クローンはインサートDNA配列として、5' 側にアダプター配列を配したヒト P G I S の c D N A の 7 4 0 b p の塩基配列を有している（配列番号 9）ことがわかり、これにより A T G を翻訳開始配列（M e t）とする 2 3 8 アミノ酸残基からなる P G I S のアミノ酸の部分配列が解明された。

#### 【 0 1 0 2 】

また、p H P G I S 1 3 5 クローンはインサートDNA配列として、3' 側にアダプター配列を配したヒト P G I S の c D N A の 1 2 7 7 b p の塩基配列を有している（配列番号 1 0）ことがわかり、これにより 2 2 6 番目のアスパラギン酸から始まるカルボキシル基側領域の P G I S の部分アミノ酸配列が解明された。後記配列表の配列番号 9 に p H P G I S 3 6 クローンに含有されるヒト P G I S の c D N A の塩基配列およびこれからコードされるアミノ酸配列を、配列番号 1 0 に p H P G I S 1 3 5 クローンに含有されるヒト P G I S の c D N A の塩基配列およびこれからコードされるアミノ酸配列を記載する。なお、図 1 にヒト P G I S の c D N A の制限酵素マップおよび λ h P G I S 1 4 1, p H P G I S 3 6 および p H P G I S 1 3 5 に含まれるDNAが当該ヒト P G I S の c D N A のどの領域に相当するかを示す。また、図 2 に p H P G I S 3 6 の制限酵素マップを、図 3 に p H P G I S 1 3 5 の制限酵素マップを示す。

【書類名】 明細書

#### 【 0 1 0 3 】

以上のクローニングにより得られたヒト P G I S の c D N A は、翻訳開始コドン周辺に Kozak ら [Nucleic Acids Res. 12, 857-872 (1984)] によって示された真核生物の開始コドンのコンセンサス配列を有しており、終止コドンに相当する T G A コドンが 5 0 0 コドン後に存在していた。これらのことから、クローニングされたヒト P G I S の c D N A は、配列番号 1 2 に示すように 5 0 0 アミノ酸残基をコードする 1 5 0 0 b p の有する 1 9 7 7 b p であることが判り、これ

によりコードされるタンパクの分子量は約 57,000 であろうと推測された。

#### 【0104】

また、当該 DNA によりコードされるアミノ酸配列を、本発明者らによって別にクローニングされたウシ由来の P G I S のアミノ酸配列と比較したところ、約 88% のホモロジーを有していることがわかった。本発明者らによるウシ P G I S の研究から、ウシ P G I S は、チトクロム P 450 7 ファミリー (CYP7) に属するコレステロール 7  $\alpha$ -ヒドロキシラーゼと 31% のホモロジーを有しており、特にチトクロム P 450 のヘム結合部位 (第 5 配位子) である 441 位の C y s 残基周辺領域が保存されていることが判っているが、本発明のヒト P G I S も同様にその領域に相当するアミノ酸配列が保存されており、かかる領域が P G I S の活性に重要な役割を担うものと考えられる。

#### 【0105】

また、ウシ P G I S は、コレステロール 7  $\alpha$ -ヒドロキシラーゼとは 31% のホモロジーがあるものの、チトクロム P 450 ファミリーに属するヒトトロノキサンシンターゼとは 16% のホモロジーしか、また既知のチトクロム P 450 タンパクのいずれとも 40% 以上のホモロジーは有しないことから、チトクロム P 450 スーパーファミリーの中の新しいファミリーであることが予想されるが、ヒト P G I S も同様にこの新しいファミリーに属するものと考えられる。

#### 【0106】

このような構造活性関連の探索は医薬品の研究開発に不可欠なものであるが、かかる探索は、ヒト P G I S の一次構造が明らかになることにより初めて成しえるものである。従って、ヒト P G I S の一次構造を初めて開示する本発明は、研究の分野のみならず産業上においても極めて重要な意義を有する。

#### 【0107】

##### 実施例 2 ヒト P G I S の発現

##### (1) ヒト P G I S の発現ベクターの構築

得られた p H P G I S 36 クローンおよび p H P G I S 135 クローンそれぞれより、cDNA インサート領域を適切な制限酵素を用いて切り出し精製する。得られる両フラグメントを熱変性 (95℃、10 分間) した後、アニーリングさ

せる。次にDNAポリメラーゼにより、オーバーラップ領域を合成開始領域として、当該領域から5'方向および3'方向の両方向に複製を行う。得られた全長cDNAを鋳型として開始コドン、終止コドンそれぞれの領域よりプライマーを合成してPCRを行う。その際、プライマーの3'には適当な制限酵素サイトをアンカー部位として構築する。

#### 【0108】

得られたPCR産物を精製後、それらの塩基配列を確認するとともに、BamHIおよびSmaI (BglII) にて消化を行い、BamHI-SmaI (BglII) フラグメントを得る。当該BamHI-SmaI (BglII) フラグメントをあらかじめBamHI-SmaI処理したpVL1393発現ベクターのBamHI-SmaI部位に導入する。作成された組換えプラスミド (PGIS7) を制限酵素マッピングおよびDNA配列分析によってキャラクタライズする。

#### 【0109】

##### (2) バキュロウイルス発現システム

Sf9細胞 (インビトロゲン社製) を10%ウシ胎児血清, 0.33%イーストレイト及び0.33%ラクトアルブミンハイドロライゼートを含むグレースインセクト培地を用いて27℃で単層培養する。組換えウイルスを産生させるため、Sf9細胞 ( $1.5 \times 10^6$  細胞) 組換えプラスミド (PGIS7, 50  $\mu$ g) と野生型バキュロウイルスDNA (AcNPV; 1  $\mu$ g) とを混合してリン酸カルシウム沈澱法によりトランスフェクトした。組換えバキュロウイルスは、プラークアッセイとプローブとして<sup>32</sup>P-ラベルしたPGISのcDNAフラグメントを使用するスロットハイブリダイゼーションとを組み合わせることによって単離し、さらに増幅させる。

#### 【0110】

該Sf9細胞を野生型バキュロウイルスまたは組換えバキュロウイルスにインフェクションする。インフェクションして3日後、細胞を集め ( $2 \times 10^8$  細胞)、10  $\mu$ Mヘミンを含む血清含有培地中、または含有しない血清含有培地中で5時間インキュベーションする。

#### 【0111】

得られた細胞をリン酸緩衝生理食塩水で洗浄し、 $-80^{\circ}\text{C}$ に保存する。細胞のミクロソーム画分を HaurandとUllrich らの方法に従って調製する(J. Biol. Chem. 260, 15059-15067)。得られた細胞 ( $2 \times 10^8$  細胞) を  $10\text{ mM}$  リン酸カリウム緩衝液 ( $\text{pH } 7.0$ )、 $10\text{ mM}$  EDTA、 $5\text{ mM}$  グルコース、 $0.1\text{ mM}$  ジチオスレイトール (DTT)、 $1.15\%$  KCl、 $2\text{ }\mu\text{g/ml}$  ロイペプチン、 $2\text{ }\mu\text{g/ml}$  ペプスタチン、 $10\text{ }\mu\text{g/ml}$  大豆トリプシン阻害剤および  $44\text{ }\mu\text{g/ml}$  フェニルメチルスルフォニルフルオリドからなる溶液  $20\text{ ml}$  でホモジナイズし、Branson sonifierモデル450を用いて30秒間、4回の超音波処理をする。

#### 【0112】

得られたホモジネートを  $7,000 \times g$  で15分間遠心して得られた上清をさらに  $105,000 \times g$  の超遠心に60分間かける。得られる沈澱を  $20\%$  グリセロール、 $1\text{ mM}$  DTTおよび  $1\text{ mM}$  EDTAを含有する  $10\text{ mM}$  リン酸カリウム緩衝液 ( $\text{pH } 7.0$ )  $3\text{ ml}$  にソニケートすることにより懸濁した。蛋白質の濃度はウシ血清アルブミンをスタンダードとして用いてLowry法によって測定し、イムノブロット分析およびPGISアッセイ用の溶液を  $5\text{ mg/ml}$  に調製する。

#### 【0113】

##### (3) ウエスタン イムノブロット分析

インフェクションされたSf9細胞とヒト血小板のミクロソーム画分を Laemmliの方法 [Nature 227, 680-685 (1979)] に従って  $10\%$  SDS-PAGEにかける。泳動されたタンパクを Towbin らの方法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 4350-4354 (1979)] に従ってポリビニリデンジフルオリド (PVDF) 膜 (イモビロン, ミリポア) 上に電気泳動的に移す。 $10\%$  ウマ血清含有トリス塩酸緩衝生理食塩水 (TBS) ( $\text{pH } 7.4$ ) を室温下で30分間前処理し、 $3\%$  スキムミルクを含むTBS中で、ブロットメンブレンをウシPGISに対するポリクローナル抗体と一緒にインキュベーションする。

#### 【0114】

$0.05\%$  Tween 20を含有するTBSで洗浄した後、メンブレンをホー

スラディッシュペルキシダーゼ（ベクター・ラボラトリーズ社製）とコンジュゲートする抗マウスIgGウマ抗体と3%スキムミルクを含有するTBSで37℃で30分間インキュベーションする。0.05%Tween20を含有するTBSで、さらにTBSで十分洗浄した後、免疫反応陽性のバンドをイムノステイニングHRPキット（コニカ製）で検出する。

#### 【0115】

##### 実施例3 抗PGISポリクローナル抗体の作製

0.5mlのリン酸緩衝生理食塩水（PBS）に溶解したPGISと等量のアジュバンドを乳化させた後、これをウサギに皮下注射する。その後、10日置きに同様の皮下注射を2回行い、最後の皮下注射から10日後に当該ウサギの血を採取する。該ウサギの血より調製したウサギ抗PGIS血清から抗PGIS/IgGをプロテインA セファロース 4B（バイオラッド社製）を用いることによって精製、取得する。

#### 【0116】

##### 実施例4 抗PGISモノクローナル抗体の作製

###### ①マウス

近交系BALB/c系マウス雄5週令を入手し、動物飼育チェンバー内（23±1℃、湿度70%）で標準ペレットを使用して飼育し、給水は任意に行う。

#### 【0117】

###### ②免疫原

ヒト由来の精製PGISを使用した。ヒトPGISはダルベッコPBSで1mg/mlとなるように調製し、100μgずつ試験管に分注し、使用するまで-80℃で凍結保存する。

#### 【0118】

###### ③免疫方法

ヒトPGIS100μg/0.5mlと同量の Freund's complete adjuvant を混合し、乳化状にした抗原20μgを5匹の5週令雄のBALB/cマウスの腹腔および背中 of 皮下十数カ所に2週間毎に2か月間投与する。2か月間の免疫の後、抗体価を測定し、抗体価の高いマウスを選んでさらに1週間毎に50μg

、 $100\mu\text{g}$ 、 $200\mu\text{g}$ を腹腔内投与し追加投与を行う。

【0119】

また、別の2匹のマウスに同様に2か月の免疫の後、1か月あけて $100\mu\text{g}$ を腹腔内に投与し、さらに1週間後 $100\mu\text{g}$ を静注注射し追加免疫を行う。

【0120】

④細胞融合

最終免疫から3日後にBALB/cマウスの摘脾を行い、EMEM培養液中で脾細胞の浮遊液を作成する。次いで脾細胞をEMEM培養液で4回洗浄した後、細胞数を算定する。

【0121】

細胞融合は、2-amino-6-oxy-8 azapuraine (8-Azaguanine) 耐性のBALB/cマウス骨髓腫由来培養細胞株(P3-X63-Ag8・653；以下、X63細胞と略す)を親細胞株として用いる。X63細胞は、非働化した胎児ウシ血清(FCS)5%を含むRPMI-1640培養液( $20\mu\text{g}/\text{ml}$ 、8-Azaguanine含有)で継代培養し、対数増殖期のX63細胞を用いRPMI-164培養液で3回洗浄した後、細胞数を算定する。

【0122】

細胞融合は、ポリエチレングリコール-4000をRPMI-1640培養液で50(w/v)%濃度となるように溶解して使用する。

【0123】

脾細胞とX63細胞の比が10:1となるように混合し、 $1500\text{rpm}$ で5分間遠心後、上清を除去し、細胞ペレットをよく懸濁し、ポリエチレングリコールを用いて、KohkerとMilsteinの方法に準じて細胞融合を行う。その後、脾細胞が $3.5 \times 10^6$ 個/mlとなるように、HAT選択培地(10%FCSを添加したRPMI-1640培養液に $1 \times 10^{-4}\text{M}$ ヒポキサンチン、 $4 \times 10^{-7}\text{M}$ アミノプテリン及び $1.6 \times 10^{-5}\text{M}$ チミジンを含む)に浮遊させる。次いで、細胞浮遊液の $100\mu\text{l}$ ずつを96穴マイクロテストプレートの各穴に分注した後、炭酸ガスインキュベータ( $37^\circ\text{C}$ 、湿度95%、8%炭酸ガス)で培養を行う。培養開始後、1日めと2日めにHAT培地を各穴に1滴ずつ、また培養開始後

7日めと9日めにHAT培地を各穴に2滴ずつ添加してさらに培養を行う。

#### 【0124】

##### ⑤スクリーニング

培養開始後、10日めより細胞のクローンが出現し、抗体産生に有無を確認するため、ハイブリドーマの培養上清を用いて抗原抗体反応試験を行う。

#### 【0125】

すなわち、ハイブリドーマの培養上清とヒトPGIS抗原液とを50 $\mu$ lずつUボトムマイクロタイタープレートに入れ、さらに抗マウスイムノグロブリン抗体を結合させたセファロース4Bの20%懸濁液を50 $\mu$ lを加えて室温で1時間攪拌した後、10分間静置する。次に抗マウスイムノグロブリン抗体結合セファロース4Bがウェルに底に完全に沈むのを確認した後、この上清を20 $\mu$ lとり、この上清中に残存するヒトPGISの濃度をPGISELISA系で測定する。このとき、ハイブリドーマの培養上清中にヒトPGISに対する抗ヒトPGISモノクローナル抗体が存在する場合には、ヒトPGISと抗ヒトPGISモノクローナル抗体とが反応し、さらに抗マウスイムノグロブリン抗体結合セファロース4Bとが抗原抗体複合体を介して沈降し、上清中に残存するヒトPGISの濃度が減少し、抗ヒトPGISモノクローナル抗体の存在が証明される。

#### 【0126】

##### 参考例1 RNAプロット分析

幾種かのサイトカインの、HAECに由来するヒトPGIS mRNAの発現に対する影響をみるためにRNAプロットハイブリダイゼーション分析を行った。

#### 【0127】

まず、幾種かのサイトカイン〔IL-1 $\alpha$  (1ng/ml)、IL-1 $\beta$  (1ng/ml)、IL-6 (2.5ng/ml)、TNF- $\alpha$  (5ng/ml)、TNF- $\beta$  (1ng/ml)〕で24時間のインキュベーション処理した各HAEC由来の全RNA (30 $\mu$ g)をホルムアミドで変性して、1.5%ホルムアルデヒドを含む1%寒天ゲル上で電気泳動し、ナイロンメンブレンにトランスファーした。プローブ〔pHPGIS 135およびグリセルアルデヒド-3-ホスフェートデヒドロゲナーゼ (GAPDH)〕をランダムプライミング法〔Feinberg, A.P., and Vogelstein, B. (1983) Anal. Bioc

hem. 132, 6-13] を用いて、 $[\alpha-^{32}\text{P}] \text{ dCTP}$  で標識した。

#### 【0128】

次に、Biochem. Biophys. Res. Commun. 178, p1479-1484 (1991) に記載の方法に従ってハイブリダイゼーションを行った。得られた膜は、最後に0.1% SDSを含有する60℃の0.1×SSC (0.15M NaCl, 0.015M クエン酸ナトリウム, pH 7.0) で洗浄し、風乾後オートラジオグラフをとった。結果を図4に示す。HAEC由来のヒトPGISのmRNAの主なバンドは、約6 kbのところに認められ、その他3本のマイナーバンドが認められた (3.2、2.5および1.7 kb)。実験の結果、IL-1 $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ もしくはIL-6とともに24時間インキュベーションしたヒトPGISのmRNAの発現は、サイトカイン処理しなかったコントロールと比較して約2倍上昇していることが認められた。しかして、サイトカインによるPGI<sub>2</sub> 産生量の増大は、サイトカインによるPGISの発現、産生の増大によるものと考えられる。逆に、サイトカインによる処理は、PGISの発現を高めることによりPGISの活性を増大させ、ひいてはPGI<sub>2</sub> 産生を促進するのに極めて有効な方法である。

#### 【0129】

##### 参考例2 PGISのmRNAの体内分布

ヒト体内におけるPGISのmRNAの発現分布をみるために、RNAブロット分析を行った。具体的には、クローンテック社より、ヒト各組織ポリA RNAを電気泳動してブロッティングしてあるフィルターを購入し、hPGIS135を上述の方法により<sup>32</sup>P標識化し、前述と同様の条件を用いてノーザンブロットハイブリダイゼーションを行った。

#### 【0130】

結果を図5および図6に示す。この結果から、PGISのmRNAはヒト組織で広く、特に子宮、心臓、骨格筋、肺、前立腺に豊富に発現しており、また小腸、腎臓、肝臓及び脳にもわずかであるが有意なレベルで発現していることが確認された。これらの結果は、従来のPGISの酵素活性および免疫反応による組織分布の報告と一致しており、PGISが血管系での作用に加えて様々な生理学的



役割を担っていることが示唆される。また、図 4 で示された 6 k b の強い主なバンドと 3 本の弱いバンドは上記全ての組織において観察されたが、弱いバンドの相対的な濃さは組織間でさまざまであった。このような転写物の多様な存在様式は、m R N A の別のスプライシングが生じている可能性もしくはプロスタグランジンエンドペルオキシダーゼにおいて見つかったような類似遺伝子（アイソザイム）の存在の可能性を示唆するものである。

## 【0131】

## 【配列表】

配列番号：1

配列の長さ：16

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直線状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

GGGACAAGGA CCACAT 16

## 【0132】

配列番号：2

配列の長さ：20

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直線状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

CAAAAGTCGC CTGTGGAAGC 20

## 【0133】

配列番号：3

配列の長さ：18

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直線状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

CACAGGCGAC TTTTGACA 18

## 【0134】

配列番号： 4

配列の長さ： 1 8

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直線状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

TGCCTGCATC TCCTCTGA

18

【 0 1 3 5 】

配列番号： 5

配列の長さ： 1 9

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直線状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

GACTCGAGTC GACATCGATT TTTTTTTTTT TTTTT

35

【 0 1 3 6 】

配列番号： 6

配列の長さ： 1 7

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直線状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

GACTCGAGTC GACATCG

17

【 0 1 3 7 】

配列番号： 7

配列の長さ： 4 8

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直線状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列の特徴：36, 37, 41, 42, 46及び47番目の記号N はそれぞれイノシンを示す。

配列

CUACUACUAC UAGGCCACGC GTCGACTAGT ACGGGNNGG NNGGGNNG 48

【0138】

配列番号：8

配列の長さ：183

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直線状

配列の種類：cDNA

起源

生物名：ヒト

株名：λhPGIS141

配列の特徴

特徴を表す記号：peptide

存在位置：1..183

特徴を決定した方法：S

配列

GGG GAC AAG GAC CAC ATG TGC AGT GTC AAA AGT CGC CTG TGG AAG CTG 48

Gly Asp Lys Asp His Met Cys Ser Val Lys Ser Arg Leu Trp Lys Leu

5

10

15

CTA TCC CCA GCC AGG CTG GCC AGG CGG GCC CAC CGG AGC AAA TGG CTG 96

Leu Ser Pro Ala Arg Leu Ala Arg Arg Ala His Arg Ser Lys Trp Leu

20

25

30

GAG AGT TAC CTG CTG CAC CTG GAG GAG ATG GGT GTG TCA GAG GAG ATG 144

Glu Ser Tyr Leu Leu His Leu Glu Glu Met Gly Val Ser Glu Glu Met

35

40

45

CAG GCA CGG GCC CTG GTG CTG CAG CTG TGG GCC ACA CAG

183

Gln Ala Arg Ala Leu Val Leu Gln Leu Trp Ala Thr Gln

50

55

60

【 0 1 3 9 】

配列番号： 9

配列の長さ： 792

配列の型： 核酸

鎖の数： 二本鎖

トポロジー： 直線状

配列の種類： cDNA

起源

生物名： ヒト

株名： p H P G I S 3 6

配列の特徴

特徴を表す記号： CDS

存在位置： 20..790

特徴を決定した方法： E

特徴を表す記号： mat peptide

存在位置： 20..790

特徴を決定した方法： S

配列

CTACTACTAC TAGGCCACGC GTCGACTAGT ACGGGGGGGG GGGGGGGGGG GCAGCCCCGC 60

CAGCCCCGCC AGCCCCGCG ATG GCT TGG GCC GCG CTC CTC GGC CTC CTG 109

Met Ala Trp Ala Ala Leu Leu Gly Leu Leu

5

10

GCC GCA CTG TTG CTG CTG CTG CTA CTG AGC CGC CGC CGC ACG CGG CGA 157

Ala Ala Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Ser Arg Arg Arg Thr Arg Arg	
15 20 25	
CCT GGT GAG CCT CCC CTG GAC CTG GGC AGC ATC CCC TGG TTG GGG TAT	205
Pro Gly Glu Pro Pro Leu Asp Leu Gly Ser Ile Pro Trp Leu Gly Tyr	
30 35 40	
GCC TTG GAC TTT GGA AAA GAT GCT GCC AGC TTC CTC ACG AGG ATG AAG	253
Ala Leu Asp Phe Gly Lys Asp Ala Ala Ser Phe Leu Thr Arg Met Lys	
45 50 55	
GAG AAG CAC GGT GAC ATC TTT ACT ATA CTG GTT GGG GGC AGG TAT GTC	301
Glu Lys His Gly Asp Ile Phe Thr Ile Leu Val Gly Gly Arg Tyr Val	
60 65 70	
ACC GTT CTC CTG GAC CCA CAC TCC TAC GAC GCG GTG GTG TGG GAG CCT	349
Thr Val Leu Leu Asp Pro His Ser Tyr Asp Ala Val Val Trp Glu Pro	
75 80 85 90	
CGC ACC AGG CTC GAC TTC CAT GCC TAT GCC ATC TTC CTC ATG GAG AGG	397
Arg Thr Arg Leu Asp Phe His Ala Tyr Ala Ile Phe Leu Met Glu Arg	
95 100 105	
ATT TTT GAT GTG CAG CTT CCA CAT TAC AGC CCC AGT GAT GAA AAG GCC	445
Ile Phe Asp Val Gln Leu Pro His Tyr Ser Pro Ser Asp Glu Lys Ala	
110 115 120	
AGG ATG AAA CTG ACT CTT CTC CAC AGA GAG CTC CAG GCA CTC ACA GAA	493
Arg Met Lys Leu Thr Leu Leu His Arg Glu Leu Gln Ala Leu Thr Glu	
125 130 135	
GCC ATG TAT ACC AAC CTC CAT GCA GTG CTG TTG GGC GAT GCT ACA GAA	541
Ala Met Tyr Thr Asn Leu His Ala Val Leu Leu Gly Asp Ala Thr Glu	
140 145 150	
GCA GGC AGT GGC TGG CAC GAG ATG GGT CTC CTC GAC TTC TCC TAC AGC	589
Ala Gly Ser Gly Trp His Glu Met Gly Leu Leu Asp Phe Ser Tyr Ser	
155 160 165 170	

TTC CTG CTC AGA GCC GGC TAC CTG ACT CTT TAC GGA ATT GAG GCG CTG 637  
Phe Leu Leu Arg Ala Gly Tyr Leu Thr Leu Tyr Gly Ile Glu Ala Leu  
175 180 185  
CCA CGC ACC CAT GAA AGC CAG GCC CAG GAC CGC GTC CAC TCA GCT GAT 685  
Pro Arg Thr His Glu Ser Gln Ala Gln Asp Arg Val His Ser Ala Asp  
190 195 200  
GTC TTC CAC ACC TTT CGC CAG CTC GAC CGG CTG CTC CCC AAA CTG GCC 733  
Val Phe His Thr Phe Arg Gln Leu Asp Arg Leu Leu Pro Lys Leu Ala  
205 210 215  
CGT GGC TCC CTG TCA GTG GGG GAC AAG GAC CAC ATG TGC AGT GTC AAA 781  
Arg Gly Ser Leu Ser Val Gly Asp Lys Asp His Met Cys Ser Val Lys  
220 225 230  
AGT CGC CTG TG 792  
Ser Arg Leu  
235

【 0 1 4 0 】

配列番号： 1 0

配列の長さ： 1 2 9 6

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直線状

配列の種類：cDNA

起源

生物名：ヒト

株名：p H P G I S 1 3 5

配列の特徴

特徴を表す記号：CDS

存在位置：3..827

特徴を決定した方法：E

特徴を表す記号：peptide

存在位置：3..827

特徴を決定した方法：S

配列

GG GAC AAG GAC CAC ATG TGC AGT GTC AAA AGT CGC CTG TGG AAG CTG	47
Asp Lys Asp His Met Cys Ser Val Lys Ser Arg Leu Trp Lys Leu	
5 10 15	
CTA TCC CCA GCC AGG CTG GCC AGG CGG GCC CAC CGG AGC AAA TGG CTG	95
Leu Ser Pro Ala Arg Leu Ala Arg Arg Ala His Arg Ser Lys Trp Leu	
20 25 30	
GAG AGT TAC CTG CTG CAC CTG GAG GAG ATG GGT GTG TCA GAG GAG ATG	143
Glu Ser Tyr Leu Leu His Leu Glu Glu Met Gly Val Ser Glu Glu Met	
35 40 45	
CAG GCA CGG GCC CTG GTG CTG CAG CTG TGG GCC ACA CAG GGG AAT ATG	191
Gln Ala Arg Ala Leu Val Leu Gln Leu Trp Ala Thr Gln Gly Asn Met	
50 55 60	
GGT CCC GCT GCC TTC TGG CTC CTG CTC TTC CTT CTC AAG AAT CCT GAA	239
Gly Pro Ala Ala Phe Trp Leu Leu Leu Phe Leu Leu Lys Asn Pro Glu	
65 70 75	
GCC CTG GCT GCT GTC CGC GGA GAG CTC GAG AGT ATC CTT TGG CAA GCG	287
Ala Leu Ala Ala Val Arg Gly Glu Leu Glu Ser Ile Leu Trp Gln Ala	
80 85 90 95	
GAG CAG CCT GTC TCG CAG ACG ACC ACT CTC CCA CAG AAG GTT CTA GAC	335
Glu Gln Pro Val Ser Gln Thr Thr Thr Leu Pro Gln Lys Val Leu Asp	
100 105 110	
AGC ACA CCT GTG CTT GAT AGC GTG CTG AGT GAG AGC CTC AGG CTT ACA	383
Ser Thr Pro Val Leu Asp Ser Val Leu Ser Glu Ser Leu Arg Leu Thr	
115 120 125	



GCT GCC CCC TTC ATC ACC CGC GAG GTT GTG GTG GAC CTG GCC ATG CCC	431
Ala Ala Pro Phe Ile Thr Arg Glu Val Val Val Asp Leu Ala Met Pro	
130 135 140	
ATG GCA GAC GGG AGA GAA TTC AAC CTG CGA CGT GGT GAC CGC CTC CTC	479
Met Ala Asp Gly Arg Glu Phe Asn Leu Arg Arg Gly Asp Arg Leu Leu	
145 150 155	
CTC TTC CCC TTC CTG AGC CCC CAG AGA GAC CCA GAA ATC TAC ACA GAC	527
Leu Phe Pro Phe Leu Ser Pro Gln Arg Asp Pro Glu Ile Tyr Thr Asp	
160 165 170 175	
CCA GAG GTA TTT AAA TAC AAC CGA TTC CTG AAC CCT GAC GGA TCA GAG	575
Pro Glu Val Phe Lys Tyr Asn Arg Phe Leu Asn Pro Asp Gly Ser Glu	
180 185 190	
AAG AAA GAC TTT TAC AAG GAT GGG AAA CGG CTG AAG AAT TAC AAC ATG	623
Lys Lys Asp Phe Tyr Lys Asp Gly Lys Arg Leu Lys Asn Tyr Asn Met	
195 200 205	
CCC TGG GGG GCG GGG CAC AAT CAC TGC CTG GGG AGG AGT TAT GCG GTC	671
Pro Trp Gly Ala Gly His Asn His Cys Leu Gly Arg Ser Tyr Ala Val	
210 215 220	
AAC AGC ATC AAA CAA TTT GTG TTC CTT GTG CTG GTG CAC TTG GAC TTG	719
Asn Ser Ile Lys Gln Phe Val Phe Leu Val Leu Val His Leu Asp Leu	
225 230 235	
GAG CTG ATC AAC GCA GAT GTG GAG ATC CCT GAG TTT GAC CTC AGC AGG	767
Glu Leu Ile Asn Ala Asp Val Glu Ile Pro Glu Phe Asp Leu Ser Arg	
240 245 250 255	
TAC GGC TTC GGT CTG ATG CAG CCG GAA CAC GAC GTG CCC GTC CGC TAC	815
Tyr Gly Phe Gly Leu Met Gln Pro Glu His Asp Val Pro Val Arg Tyr	
260 265 270	
CGC ATC CGC CCA TGACACAGGG AGCAGATGGA TCCACGTGCT CGCCTCTGCC	867
Arg Ile Arg Pro	

275

CAGCCTGCCC CAGCCTGCCC CAGCCTCCCA GCTTTCTGTG TGCACAGTTG GCCCGGGTGC 927  
AGGTGCTAGC ATTACCACTT CCCTGCTTTT CTCCCAGAAG GCTGGGTCCA GGGGAGGGAA 987  
AAGCTAAGAG GGTGAACAAA GAAAAGACAT TGAAAGCTCT ATGGATTATC CACTGCAAAG 1047  
TTTTCTTTCC AAAATCAGGC TTTGTCTGCT CCCAATTCAC CTCGTTACTC TCACCTCGTG 1107  
ATATCCACAA ATGCTATTCA GATAAGGCAG AACTAGGAGT CTTCCTGCT CTGCCCCCAA 1167  
CTCCCGGAGG TGTCACCTTC CTAGTTCTTA TGAGCTAGCA TGGCCCGGGC CTTATCCAGT 1227  
CAAAGCGGAT GCTGGCCACA GAAAGGCCAC TCAGGATGTC CTTTGTGTCC ATCGATGTCT 1287  
ACTCGAGTC 1296

【 0 1 4 1 】

配列番号： 1 1

配列の長さ：1977

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直線状

配列の種類：cDNA

起源

生物名：ヒト

配列の特徴

特徴を表す記号：CDS

存在位置：28..1527

特徴を決定した方法：E

特徴を表す記号：mat peptide

存在位置：28..1527

特徴を決定した方法：S

配列

AGCCCCGCCA GCCCCGCCAG CCCC GCG ATG GCT TGG GCC GCG CTC CTC GGC 51

Met Ala Trp Ala Ala Leu Leu Gly

5

CTC CTG GCC GCA CTG TTG CTG CTG CTG CTA CTG AGC CGC CGC CGC ACG	99
Leu Leu Ala Ala Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Ser Arg Arg Arg Thr	
10 15 20	
CGG CGA CCT GGT GAG CCT CCC CTG GAC CTG GGC AGC ATC CCC TGG TTG	147
Arg Arg Pro Gly Glu Pro Pro Leu Asp Leu Gly Ser Ile Pro Trp Leu	
25 30 35 40	
GGG TAT GCC TTG GAC TTT GGA AAA GAT GCT GCC AGC TTC CTC ACG AGG	195
Gly Tyr Ala Leu Asp Phe Gly Lys Asp Ala Ala Ser Phe Leu Thr Arg	
45 50 55	
ATG AAG GAG AAG CAC GGT GAC ATC TTT ACT ATA CTG GTT GGG GGC AGG	243
Met Lys Glu Lys His Gly Asp Ile Phe Thr Ile Leu Val Gly Gly Arg	
60 65 70	
TAT GTC ACC GTT CTC CTG GAC CCA CAC TCC TAC GAC GCG GTG GTG TGG	231
Tyr Val Thr Val Leu Leu Asp Pro His Ser Tyr Asp Ala Val Val Trp	
75 80 85	
GAG CCT CGC ACC AGG CTC GAC TTC CAT GCC TAT GCC ATC TTC CTC ATG	339
Glu Pro Arg Thr Arg Leu Asp Phe His Ala Tyr Ala Ile Phe Leu Met	
90 95 100	
GAG AGG ATT TTT GAT GTG CAG CTT CCA CAT TAC AGC CCC AGT GAT GAA	387
Glu Arg Ile Phe Asp Val Gln Leu Pro His Tyr Ser Pro Ser Asp Glu	
105 110 115 120	
AAG GCC AGG ATG AAA CTG ACT CTT CTC CAC AGA GAG CTC CAG GCA CTC	435
Lys Ala Arg Met Lys Leu Thr Leu Leu His Arg Glu Leu Gln Ala Leu	
125 130 135	
ACA GAA GCC ATG TAT ACC AAC CTC CAT GCA GTG CTG TTG GGC GAT GCT	483
Thr Glu Ala Met Tyr Thr Asn Leu His Ala Val Leu Leu Gly Asp Ala	
140 145 150	
ACA GAA GCA GGC AGT GGC TGG CAC GAG ATG GGT CTC CTC GAC TTC TCC	531

Thr Glu Ala Gly Ser Gly Trp His Glu Met Gly Leu Leu Asp Phe Ser	
155	160
TAC AGC TTC CTG CTC AGA GCC GGC TAC CTG ACT CTT TAC GGA ATT GAG	579
Tyr Ser Phe Leu Leu Arg Ala Gly Tyr Leu Thr Leu Tyr Gly Ile Glu	
170	175
GCG CTG CCA CGC ACC CAT GAA AGC CAG GCC CAG GAC CGC GTC CAC TCA	627
Ala Leu Pro Arg Thr His Glu Ser Gln Ala Gln Asp Arg Val His Ser	
185	190
GCT GAT GTC TTC CAC ACC TTT CGC CAG CTC GAC CGG CTG CTC CCC AAA	675
Ala Asp Val Phe His Thr Phe Arg Gln Leu Asp Arg Leu Leu Pro Lys	
205	210
CTG GCC CGT GGC TCC CTG TCA GTG GGG GAC AAG GAC CAC ATG TGC AGT	723
Leu Ala Arg Gly Ser Leu Ser Val Gly Asp Lys Asp His Met Cys Ser	
220	225
GTC AAA AGT CGC CTG TGG AAG CTG CTA TCC CCA GCC AGG CTG GCC AGG	771
Val Lys Ser Arg Leu Trp Lys Leu Leu Ser Pro Ala Arg Leu Ala Arg	
235	240
CGG GCC CAC CGG AGC AAA TGG CTG GAG AGT TAC CTG CTG CAC CTG GAG	819
Arg Ala His Arg Ser Lys Trp Leu Glu Ser Tyr Leu Leu His Leu Glu	
250	255
GAG ATG GGT GTG TCA GAG GAG ATG CAG GCA CGG GCC CTG GTG CTG CAG	867
Glu Met Gly Val Ser Glu Glu Met Gln Ala Arg Ala Leu Val Leu Gln	
265	270
CTG TGG GCC ACA CAG GGG AAT ATG GGT CCC GCT GCC TTC TGG CTC CTG	915
Leu Trp Ala Thr Gln Gly Asn Met Gly Pro Ala Ala Phe Trp Leu Leu	
285	290
CTC TTC CTT CTC AAG AAT CCT GAA GCC CTG GCT GCT GTC CGC GGA GAG	963
Leu Phe Leu Leu Lys Asn Pro Glu Ala Leu Ala Ala Val Arg Gly Glu	
300	305
	310

CTC GAG AGT ATC CTT TGG CAA GCG GAG CAG CCT GTC TCG CAG ACG ACC	1011
Leu Glu Ser Ile Leu Trp Gln Ala Glu Gln Pro Val Ser Gln Thr Thr	
315 320 325	
ACT CTC CCA CAG AAG GTT CTA GAC AGC ACA CCT GTG CTT GAT AGC GTG	1059
Thr Leu Pro Gln Lys Val Leu Asp Ser Thr Pro Val Leu Asp Ser Val	
330 335 340	
CTG AGT GAG AGC CTC AGG CTT ACA GCT GCC CCC TTC ATC ACC CGC GAG	1107
Leu Ser Glu Ser Leu Arg Leu Thr Ala Ala Pro Phe Ile Thr Arg Glu	
345 350 355 360	
GTT GTG GTG GAC CTG GCC ATG CCC ATG GCA GAC GGG AGA GAA TTC AAC	1155
Val Val Val Asp Leu Ala Met Pro Met Ala Asp Gly Arg Glu Phe Asn	
365 370 375	
CTG CGA CGT GGT GAC CGC CTC CTC CTC TTC CCC TTC CTG AGC CCC CAG	1203
Leu Arg Arg Gly Asp Arg Leu Leu Leu Phe Pro Phe Leu Ser Pro Gln	
380 385 390	
AGA GAC CCA GAA ATC TAC ACA GAC CCA GAG GTA TTT AAA TAC AAC CGA	1251
Arg Asp Pro Glu Ile Tyr Thr Asp Pro Glu Val Phe Lys Tyr Asn Arg	
395 400 405	
TTC CTG AAC CCT GAC GGA TCA GAG AAG AAA GAC TTT TAC AAG GAT GGG	1299
Phe Leu Asn Pro Asp Gly Ser Glu Lys Lys Asp Phe Tyr Lys Asp Gly	
410 415 420	
AAA CGG CTG AAG AAT TAC AAC ATG CCC TGG GGG GCG GGG CAC AAT CAC	1347
Lys Arg Leu Lys Asn Tyr Asn Met Pro Trp Gly Ala Gly His Asn His	
425 430 435 440	
TGC CTG GGG AGG AGT TAT GCG GTC AAC AGC ATC AAA CAA TTT GTG TTC	1395
Cys Leu Gly Arg Ser Tyr Ala Val Asn Ser Ile Lys Gln Phe Val Phe	
445 450 455	
CTT GTG CTG GTG CAC TTG GAC TTG GAG CTG ATC AAC GCA GAT GTG GAG	1443
Leu Val Leu Val His Leu Asp Leu Glu Leu Ile Asn Ala Asp Val Glu	

```

          460              465              470
ATC CCT GAG TTT GAC CTC AGC AGG TAC GGC TTC GGT CTG ATG CAG CCG 1491
Ile Pro Glu Phe Asp Leu Ser Arg Tyr Gly Phe Gly Leu Met Gln Pro

          475              480              485
GAA CAC GAC GTG CCC GTC CGC TAC CGC ATC CGC CCA TGACACAGGG 1537
Glu His Asp Val Pro Val Arg Tyr Arg Ile Arg Pro

          490              495              500
AGCAGATGGA TCCACGTGCT CGCCTCTGCC CAGCCTGCCC CAGCCTGCCC CAGCCTCCCA 1597
GCTTTCTGTG TGCACAGTTG GCCCGGGTGC AGGTGCTAGC ATTACCACTT CCCTGCTTTT 1657
CTCCCAGAAG GCTGGGTCCA GGGGAGGGAA AAGCTAAGAG GGTGAACAAA GAAAAGACAT 1717
TGAAAGCTCT ATGGATTATC CACTGCAAAG TTTTCTTTCC AAAATCAGGC TTTGTCTGCT 1777
CCCAATTAC CTCGTTACTC TCACCTCGTG ATATCCACAA ATGCTATTCA GATAAGGCAG 1837
AACTAGGAGT CTTCACTGCT CTGCCCCCAA CTCCCGGAGG TGTCACCTTC CTAGTTCTTA 1897
TGAGCTAGCA TGGCCCGGGC CTTATCCAGT CAAAGCGGAT GCTGGCCACA GAAAGGCCAC 1957
TCAGGATGTC CTTTGTGTCC 1977

```

【 0 1 4 2 】

配列番号： 1 2

配列の長さ： 500

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直線状

配列の種類：ペプチド

配列

Met Ala Trp Ala Ala Leu Leu Gly Leu Leu Ala Ala Leu Leu Leu Leu

5

10

15

Leu Leu Leu Ser Arg Arg Arg Thr Arg Arg Pro Gly Glu Pro Pro Leu

20

25

30

Asp Leu Gly Ser Ile Pro Trp Leu Gly Tyr Ala Leu Asp Phe Gly Lys

35

40

45

Asp Ala Ala Ser Phe Leu Thr Arg Met Lys Glu Lys His Gly Asp Ile

50	55	60
Phe Thr Ile Leu Val Gly Gly Arg Tyr Val Thr Val Leu Leu Asp Pro		
65	70	75
80		
His Ser Tyr Asp Ala Val Val Trp Glu Pro Arg Thr Arg Leu Asp Phe		
85	90	95
His Ala Tyr Ala Ile Phe Leu Met Glu Arg Ile Phe Asp Val Gln Leu		
100	105	110
Pro His Tyr Ser Pro Ser Asp Glu Lys Ala Arg Met Lys Leu Thr Leu		
115	120	125
Leu His Arg Glu Leu Gln Ala Leu Thr Glu Ala Met Tyr Thr Asn Leu		
130	135	140
His Ala Val Leu Leu Gly Asp Ala Thr Glu Ala Gly Ser Gly Trp His		
145	150	155
160		
Glu Met Gly Leu Leu Asp Phe Ser Tyr Ser Phe Leu Leu Arg Ala Gly		
165	170	175
Tyr Leu Thr Leu Tyr Gly Ile Glu Ala Leu Pro Arg Thr His Glu Ser		
180	185	190
Gln Ala Gln Asp Arg Val His Ser Ala Asp Val Phe His Thr Phe Arg		
195	200	205
Gln Leu Asp Arg Leu Leu Pro Lys Leu Ala Arg Gly Ser Leu Ser Val		
210	215	220
Gly Asp Lys Asp His Met Cys Ser Val Lys Ser Arg Leu Trp Lys Leu		
225	230	235
240		
Leu Ser Pro Ala Arg Leu Ala Arg Arg Ala His Arg Ser Lys Trp Leu		
245	250	255
Glu Ser Tyr Leu Leu His Leu Glu Glu Met Gly Val Ser Glu Glu Met		
260	265	270
Gln Ala Arg Ala Leu Val Leu Gln Leu Trp Ala Thr Gln Gly Asn Met		
275	280	285

Gly Pro Ala Ala Phe Trp Leu Leu Leu Phe Leu Leu Lys Asn Pro Glu  
290 295 300  
Ala Leu Ala Ala Val Arg Gly Glu Leu Glu Ser Ile Leu Trp Gln Ala  
305 310 315 320  
Glu Gln Pro Val Ser Gln Thr Thr Thr Leu Pro Gln Lys Val Leu Asp  
325 330 335  
Ser Thr Pro Val Leu Asp Ser Val Leu Ser Glu Ser Leu Arg Leu Thr  
340 345 350  
Ala Ala Pro Phe Ile Thr Arg Glu Val Val Val Asp Leu Ala Met Pro  
355 360 365  
Met Ala Asp Gly Arg Glu Phe Asn Leu Arg Arg Gly Asp Arg Leu Leu  
370 375 380  
Leu Phe Pro Phe Leu Ser Pro Gln Arg Asp Pro Glu Ile Tyr Thr Asp  
385 390 395 400  
Pro Glu Val Phe Lys Tyr Asn Arg Phe Leu Asn Pro Asp Gly Ser Glu  
405 410 415  
Lys Lys Asp Phe Tyr Lys Asp Gly Lys Arg Leu Lys Asn Tyr Asn Met  
420 425 430  
Pro Trp Gly Ala Gly His Asn His Cys Leu Gly Arg Ser Tyr Ala Val  
435 440 445  
Asn Ser Ile Lys Gln Phe Val Phe Leu Val Leu Val His Leu Asp Leu  
450 455 460  
Glu Leu Ile Asn Ala Asp Val Glu Ile Pro Glu Phe Asp Leu Ser Arg  
465 470 475 480  
Tyr Gly Phe Gly Leu Met Gln Pro Glu His Asp Val Pro Val Arg Tyr  
485 490 495  
Arg Ile Arg Pro  
500



**【図面の簡単な説明】****【図 1】**

ヒト P G I S の c D N A の制限酵素マップ、および  $\lambda$  h P G I S 1 4 1、p H P G I S 1 3 5 および p H P G I S 3 6 に含有される P G I S の D N A の領域を示す図である。

**【図 2】**

プラスミド p H P G I S 3 6 の制限酵素マップを示す図である。

**【図 3】**

プラスミド p H P G I S 1 3 5 の制限酵素マップを示す図である。

**【図 4】**

サイトカインで処理したヒト P G I S の m R N A の R N A ブロット（電気泳動）分析の結果を示す写真である。

**【図 5】**

P G I S の m R N A のヒト体内（脾臓、腎臓、骨格筋、肝臓、肺、胎盤、脳、心臓）における発現分布を電気泳動的に示す写真である。

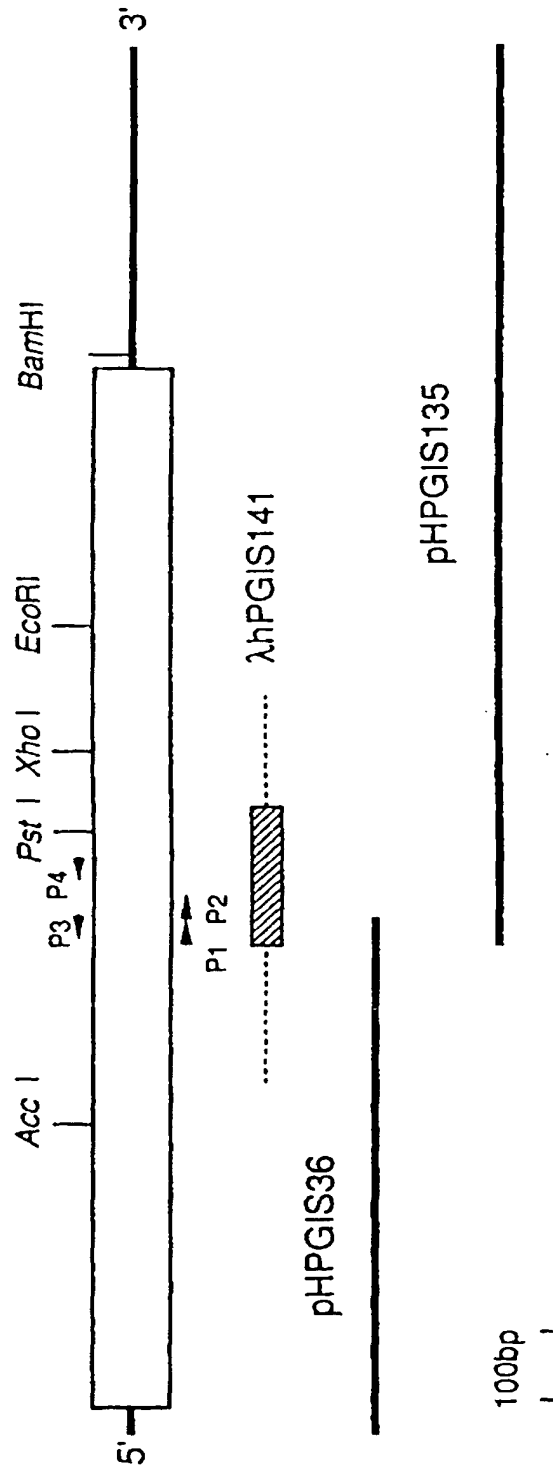
**【図 6】**

P G I S の m R N A のヒト体内（周辺白血球、大腸、小腸、卵巣、睾丸、前立腺、胸腺、脾臓）における発現分布を電気泳動的に示す写真である。

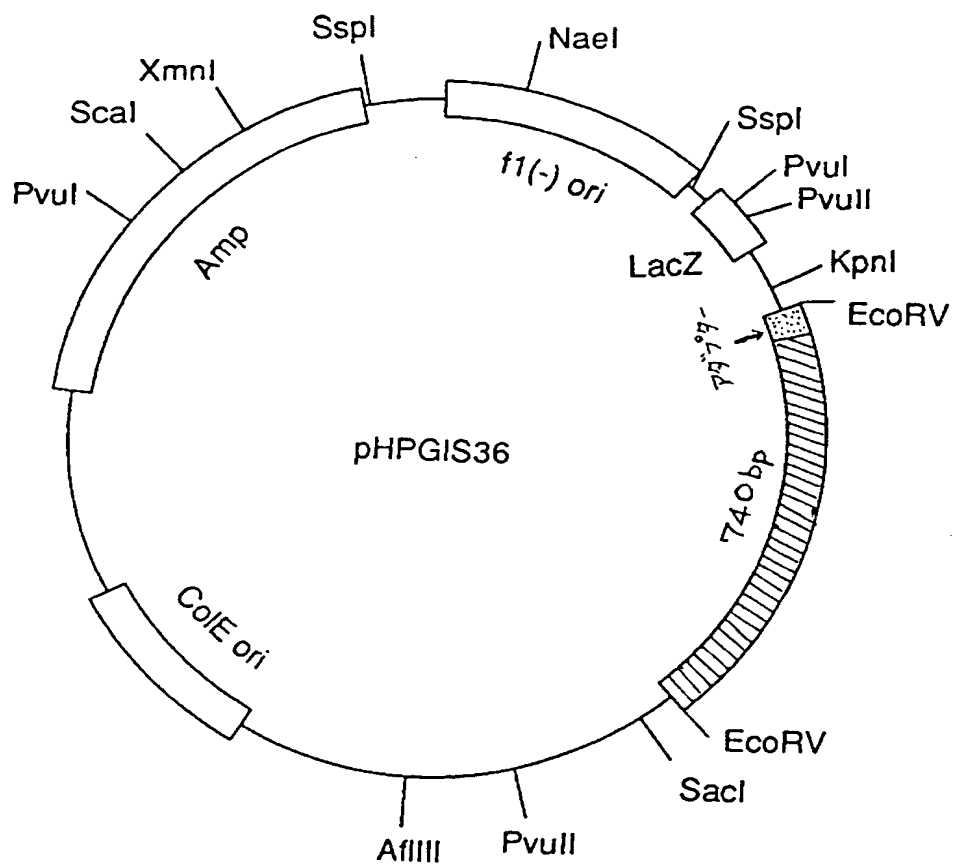
【書類名】

図面

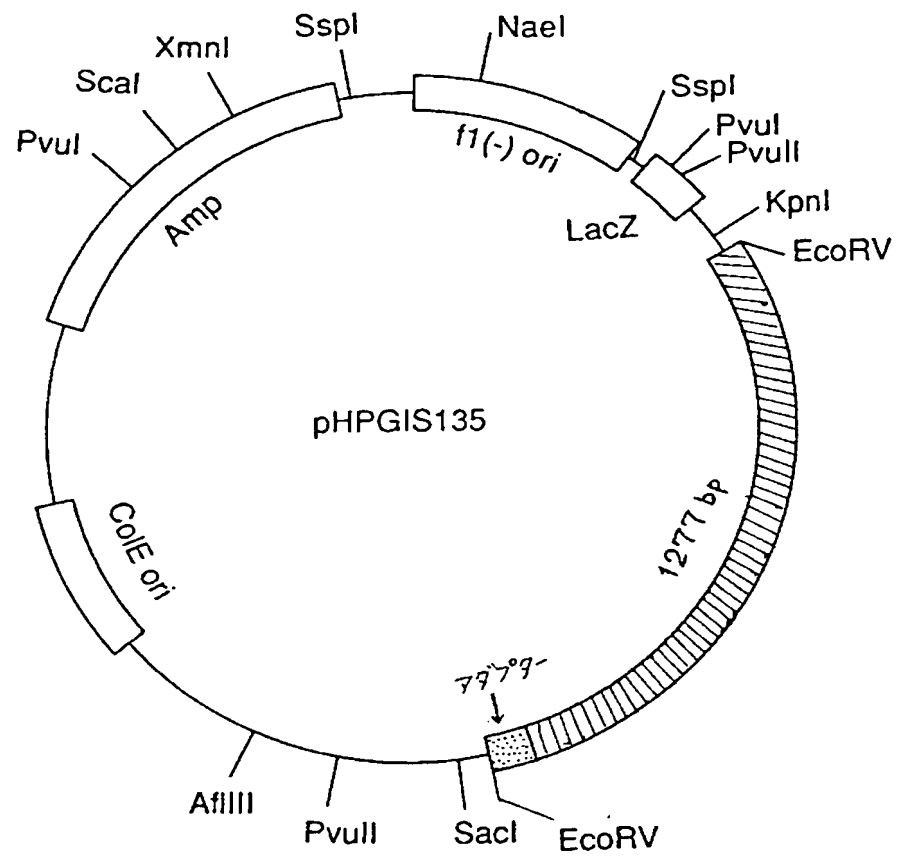
【図1】



【図 2】

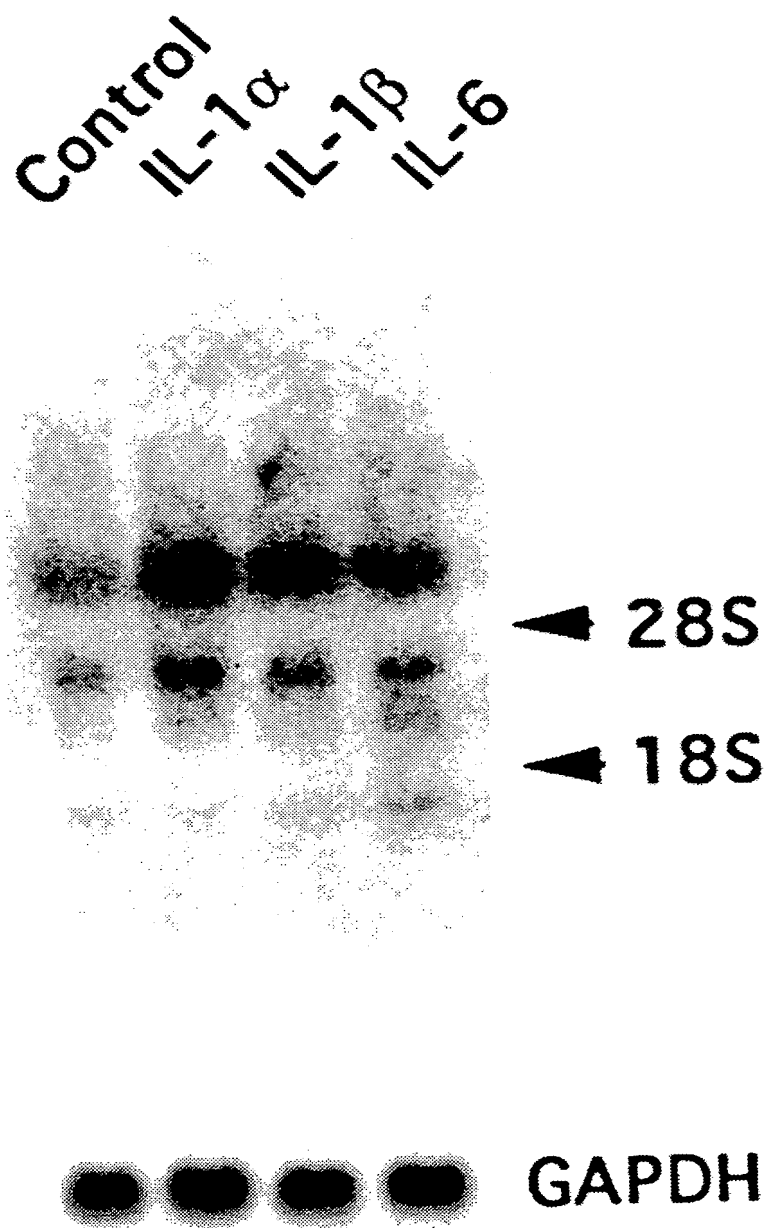


【図3】



【図4】

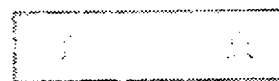
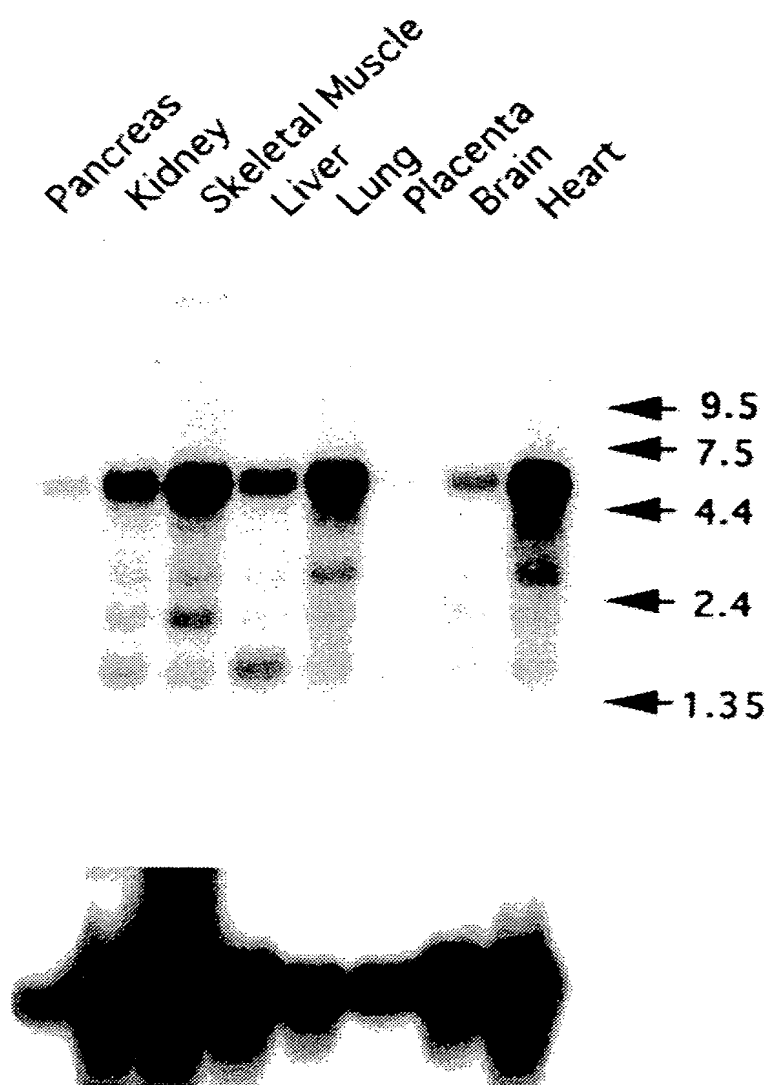
図4代印写真



10 14

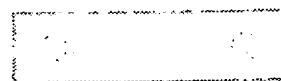
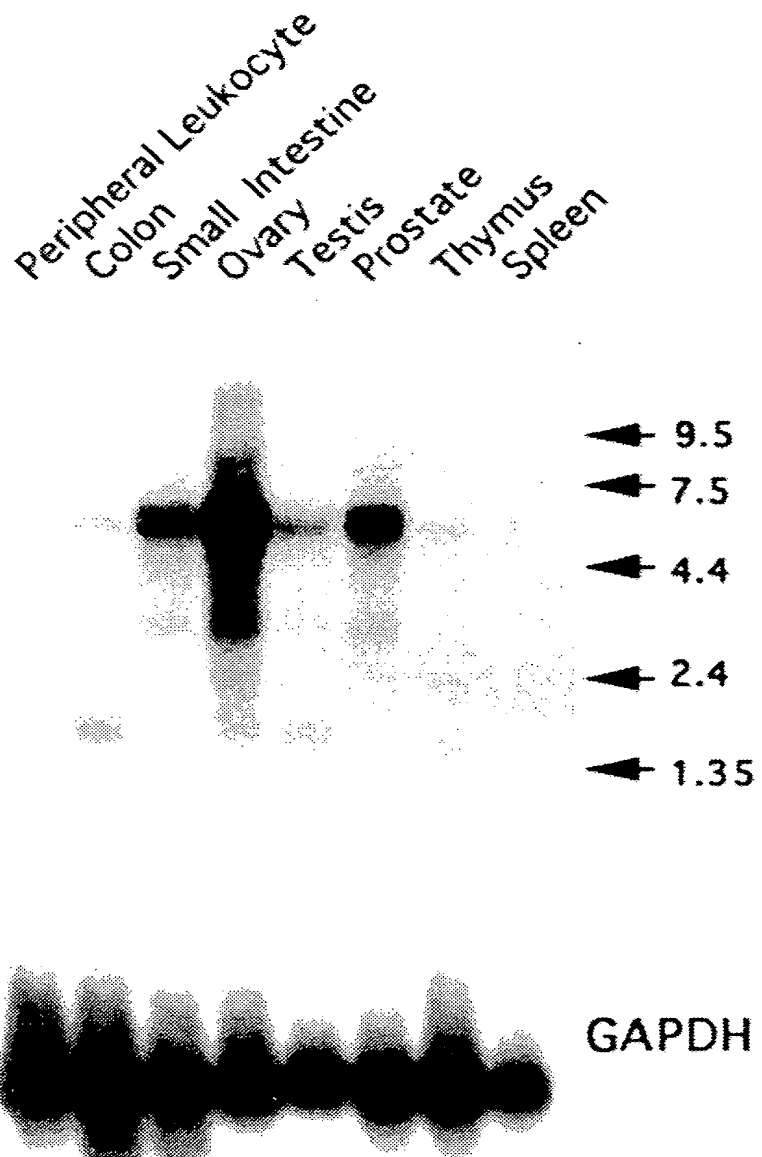
【図5】

図5代用写真



【図 6】

図 6 代理写真



【書類名】 要約書

【要約】

【構成】 実質的に配列番号12で示されるヒト由来プロスタサイクリンシンターゼ(PGIS)のアミノ酸配列をコードする塩基配列を有するDNA を含むDNA 、該DNA を含有するベクター、該ベクターで形質転換された宿主細胞、該宿主細胞を培地中で培養することによるヒト由来PGISの製造法。実質的に配列番号12で示されるヒト由来PGISのアミノ酸配列を有するポリペプチド、当該ヒト由来PGISに反応性を示す抗体。

【効果】 ヒト由来PGISの一次構造、それをコードする塩基配列を明らかにする。PGIS及びそのDNA は、PGI<sub>2</sub> とTXA<sub>2</sub> との産生量不均衡による循環器系疾患の治療薬開発のための試薬、PGIS又はそのmRNAの体内組織発現レベルの測定用診断薬として有用。またPGIS等を疾患部位特異的に生体内に導入することによる循環器系疾患の治療薬としての利用。本製造法はヒト由来PGISの簡便、効率的量産に有用。本抗体はヒト由来PGISの精製、免疫組織化学的、病因解析に有用。

【選択図】 なし





国際様式 INTERNATIONAL FORM

〔 特許手続上の微生物の寄託の国際的承認  
に関するブダペスト条約 〕

下記国際寄託当局によって規則7.1に従い  
発行される

原寄託についての受託証

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL  
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF  
MICROORGANISMS FOR THE PURPOSES OF  
PATENT PROCEDURE

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL  
DEPOSIT

issued pursuant to Rule 7.1 by the  
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY  
identified at the bottom of this  
page.

氏名 (名称) 日本たばこ産業株式会社  
代表取締役社長 水野 繁  
寄託者 あて名 ④ 140  
東京都品川区東品川四丁目12番62号

殿

I. 微生物の表示	
(寄託者が付した識別のための表示) PBJT-BA-4	(受託番号) FERM BP- 4653
II. 科学的性質及び分類学上の位置	
I 欄の微生物には、次の事項を記載した文書が添付されていた。 <input checked="" type="checkbox"/> 科学的性質 <input checked="" type="checkbox"/> 分類学上の位置	
III. 受領及び受託	
本国際寄託当局は、平成 6 年 4 月 26 日 (原寄託日) に受領した I 欄の微生物を受託する。	
IV. 移管請求の受領	
本国際寄託当局は、年 月 日 (原寄託日) に I 欄の微生物を受領した。 そして、年 月 日に原寄託よりブダペスト条約に基づく寄託への移管請求を受領した。	
V. 国際寄託当局	
通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所 名称: National Institute of Advanced Industrial Science and Human-Technology Agency of Science and Technology 所長 鈴木 敏 (Osamu Suzuki) DIRECTOR GENERAL. あて名: 日本国茨城県 1 丁目 1 番 3 号 (郵便番号 305) 1-3, Higashi 1 chome Tsukuba-shi Ibaraki-ken 305, JAPAN 平成 6 年 (1994) 4 月 26 日	



国際様式 INTERNATIONAL FORM

〔 特許手続上の微生物の寄託の国際的承認  
に関するブダペスト条約 〕下記国際寄託当局によって規則7.1に従い  
発行される

原寄託についての受託証

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL  
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF  
MICROORGANISMS FOR THE PURPOSES OF  
PATENT PROCEDURERECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL  
DEPOSITissued pursuant to Rule 7.1 by the  
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY  
identified at the bottom of this  
page.

氏名 (名称)

日本たばこ産業株式会社

代表取締役社長 水野 繁

寄託者

あて名

① 140

東京都品川区東品川四丁目12番62号

殿

I. 微生物の表示	
(寄託者が付した識別のための表示) PBJT-BA 5	(受託番号) FERM BP- 4654
II. 科学的性質及び分類学上の位置	
I 欄の微生物には、次の事項を記載した文書が添付されていた。 <input checked="" type="checkbox"/> 科学的性質 <input checked="" type="checkbox"/> 分類学上の位置	
III. 受領及び受託	
本国際寄託当局は、平成 6 年 4 月 26 日 (原寄託口) に受領した I 欄の微生物を受託する。	
IV. 移管請求の受領	
本国際寄託当局は、 年 月 日 (原寄託日) に I 欄の微生物を受領した。 そして、 年 月 日に原寄託よりブダペスト条約に基づく寄託への移管請求を受領した。	
V. 国際寄託当局	
通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所 名称: National Institute of Advanced Industrial Science and Human-Technology Agency of Industrial Science and Technology 所長 鈴木 Osamu 〓 DIRECTOR GENERAL. あて名: 日本国茨城県 土浦市 東1丁目1番3号 (郵便番号 305) 1-3, Higashi 1 chome Tsukuba-shi Ibaraki-ken 305. JAPAN 平成 6 年 (1994) 4 月 26 日	

【書類名】 職権訂正データ  
【訂正書類】 特許願

## &lt;認定情報・付加情報&gt;

【特許出願人】  
【識別番号】 000004569  
【住所又は居所】 東京都品川区東品川 4 丁目 1 2 番 6 2 号  
【氏名又は名称】 日本たばこ産業株式会社  
【代理人】 申請人  
【識別番号】 100080791  
【住所又は居所】 大阪府大阪市中央区平野町 3 丁目 3 番 9 号 (湯木ビル) 高島国際特許事務所  
【氏名又は名称】 高島 一  
【提出された物件の記事】  
【提出物件名】 原寄託についての受託証 2

【書類名】 出願人名義変更届

【提出日】 平成 7年 6月26日

【あて先】 特許庁長官殿

【事件の表示】

    【出願番号】 平成 6年特許願第114316号

【発明の名称】 ヒト由来プロスタサイクリンシンターゼ

【承継人】

    【住所又は居所】 大阪府豊中市東豊中町 3 丁目 1 8 番 1 3 号

    【氏名又は名称】 田邊 忠

【承継人代理人】

    【識別番号】 100080791

    【弁理士】

    【氏名又は名称】 高島 一

    【電話番号】 06-227-1156

【手数料の表示】

    【納付方法】 予納

    【予納台帳番号】 006965

    【納付金額】 4,400円

【提出物件の目録】

    【物件名】 承継人であることを証明する書面 1

    【物件名】 委任状 1

**譲 渡 証 書**

平成 7 年 5 月 29 日

住 所 大阪府豊中市東豊中町3丁目18番13号

譲受人 田 邊 忠 殿

住 所 東京都港区虎ノ門二丁目2番1号

譲渡人 日本たばこ産業株式会社

代表者 水 野



下記発明に関する特許を受ける権利を貴殿に譲渡したことに相違ありません。

**記**

1. 出願番号 平成6年特許願第114316号
2. 発明の名称 「ヒト由来プロスタサイクリンシンターゼ」

整理番号


## 委任状

平成 7 年 5 月 29 日

私は、識別番号 100080791 弁理士 ー 氏を以って

代理人として下記事項を委任します。

### 記

1. 平成6年特許願第114316号  
発明の名称 「ヒト由来プロスタサイクリンシンターゼ」  
に関する一切の件並びに本件に関する放棄若しくは取下げ、出願変更、拒絶査定不服及び補正却下の決定に対する審判の請求並びに取下げ。
2. 上記出願又は平成 年 願 号  
に基づく「特許法第41条第1項及び実用新案法第8条第1項の」優先権主張並びにその取下げ。
3. 上記出願の分割出願及び補正却下の決定に対する新たな出願に関する一切の件並びに本件に関する上記事項一切。
4. 上記出願に関する審査請求、優先審査に関する事情説明書の提出、刊行物の提出、証明の請求及び上記出願又は審判請求に関する物件の下附を受けること。
5. 第1項に関する通常実施権許諾の裁定請求、裁定取消請求並びにそれ等に対する答弁、取下其他本件に関する提出書類及び物件の下附を受けること。
6. 上記各項に関し行政不服審査法に基づく諸手続を為すこと。
7. 上記事項を処理する為、復代理人を選任及び解任すること。
8. 使用に基づく特例の適用の主張の取下げ。

識別番号

住 所 大阪府豊中市東豊中町3丁目18番13号

氏名(名称) 田 邊 忠  
(代表者)



【書類名】 職権訂正データ  
【訂正書類】 出願人名義変更届

## &lt;認定情報・付加情報&gt;

【承継人】  
【識別番号】 595110128  
【住所又は居所】 大阪府豊中市東豊中町 3 丁目 1 8 番 1 3 号  
【氏名又は名称】 田邊 忠  
【代理人】 申請人  
【識別番号】 100080791  
【住所又は居所】 大阪府大阪市中央区平野町 3 丁目 3 番 9 号 (湯木ビル) 高島国際特許事務所  
【氏名又は名称】 高島 一  
【提出された物件の記事】  
【提出物件名】 委任状 (代理権を証明する書面) 1  
承継人であることを証明する書面 1

特願平 0 6 - 1 1 4 3 1 6

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[ 0 0 0 0 0 4 5 6 9 ]

1. 変更年月日

1 9 9 1 年 7 月 1 日

[変更理由]

住所変更

住 所

東京都品川区東品川 4 丁目 1 2 番 6 2 号

氏 名

日本たばこ産業株式会社

2. 変更年月日

1 9 9 5 年 5 月 1 6 日

[変更理由]

住所変更

住 所

東京都港区虎ノ門二丁目 2 番 1 号

氏 名

日本たばこ産業株式会社



特願平 06 - 114316

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[ 5 9 5 1 1 0 1 2 8 ]

1. 変更年月日

1995年 6月26日

[変更理由]

新規登録

住 所

大阪府豊中市東豊中町3丁目18番13号

氏 名

田邊 忠